

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003094

International filing date: 18 February 2005 (18.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-216083  
Filing date: 23 July 2004 (23.07.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 07 April 2005 (07.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

18.02.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 4 年   7 月 2 3 日  
Date of Application:

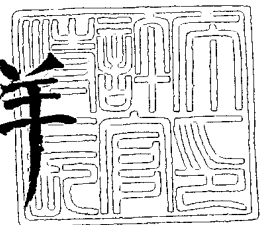
出 願 番 号            特 願 2 0 0 4 - 2 1 6 0 8 3  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 4 - 2 1 6 0 8 3 ]

出   願   人            株 式 会 社   イ ツ キ  
Applicant(s):

2 0 0 5 年   3 月 2 5 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願  
【整理番号】 P04-0640  
【提出日】 平成16年 7月23日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12N 1/00  
【発明者】  
    【住所又は居所】 埼玉県朝霞市幸町 3 丁目 1 2 番 5 号 株式会社 イツキ内  
    【氏名】 油木 大樹  
【発明者】  
    【住所又は居所】 埼玉県朝霞市幸町 3 丁目 1 2 番 5 号 株式会社 イツキ内  
    【氏名】 木曾 皓  
【特許出願人】  
    【識別番号】 504078512  
    【氏名又は名称】 株式会社 イツキ  
【代理人】  
    【識別番号】 100091096  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 平木 祐輔  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100096183  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 石井 貞次  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100118773  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 藤田 節  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100101904  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 島村 直己  
【先の出願に基づく優先権主張】  
    【出願番号】 特願2004- 55059  
    【出願日】 平成16年 2月27日  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 015244  
    【納付金額】 16,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

植物病原性の細菌、糸状菌またはウイルスの感染または増殖を抑制する能力を有するバチルス属に属する細菌を含む、植物病害の防除剤または防除資材。

**【請求項 2】**

植物病原性の細菌、糸状菌またはウイルスの感染または増殖を抑制する能力を有するバチルス属に属する細菌がDAIJU-SIID2550（受託番号FERM P-19591）またはその変異株である請求項 1 に記載の防除剤または防除資材。

**【請求項 3】**

植物病原性細菌がアグロバクテリウム属、クラビバクター属、エルウィニア属、シュードモナス属、ラルストニア属、コリネバクテリウム属、クルトバクテリウム属、バークホルデリア属またはキサントモナス属に属する細菌であり、植物病害が該細菌による病害である請求項 1 または 2 に記載の防除剤または防除資材。

**【請求項 4】**

植物病原性糸状菌が空気伝染性糸状菌または土壌伝染性糸状菌であり、植物病害が該糸状菌による病害である請求項 1 または 2 に記載の防除剤または防除資材。

**【請求項 5】**

植物病原性ウイルスが、タバコモザイクウイルス、トウガラシマイルドモットルウイルス、トマトモザイクウイルス、メロンえそ斑点ウイルス、スイカ緑斑モザイクウイルスまたはキュウリ緑斑モザイクウイルスであり、植物病害が該ウイルスによる病害である請求項 1 または 2 に記載の防除剤または防除資材。

**【請求項 6】**

請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の防除剤または防除資材を植物病原性の細菌、糸状菌またはウイルスの宿主となる植物に施用することを含む植物病害の防除方法。

**【請求項 7】**

植物がアブラナ科、ナス科、ウリ科、ユリ科、マメ科、キク科、アカザ科、イネ科、バラ科、ナデシコ科、サクラソウ科、ミカン科、ブドウ科、マタタビ科、カキ科、セリ科、ヒルガオ科、またはサトイモ科に属する植物である請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

植物への施用方法が、細菌を植物の種子に塗布する処理、細菌を含む懸濁液に植物の種子を浸漬する処理、細菌を植物の栽培土壌に灌注する処理、細菌を植物の栽培土壌に混和する処理、細菌を植物の茎葉に散布する処理、および、細菌を植物の付傷部に接触させる処理からなる群から選択される少なくとも 1 つの処理を含む、請求項 6 または 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

新規バチルス属細菌DAIJU-SIID2550（受託番号FERM P-19591）株。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】バチルス属細菌を用いた植物病害の防除方法および防除剤

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明は細菌性、糸状菌性またはウイルス性の植物病害の防除方法およびそのための防除剤または防除資材に関する。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

野菜類などの換金作物の農業的栽培においては、種子伝染性、土壌伝染性、空気（水媒）伝染性の植物病害の発生により、生産物の良質・安定・多収益を困難にすることが多い。特に病害が発生し易い異常気象条件に遭遇すると生産農家は致命的な打撃を受ける。

## 【0 0 0 3】

これらの伝染性病害発生原因として認知されているものは、主に糸状菌（かび）、細菌（バクテリア）及びウイルスであり、正常な栽培が行われるためには、これらの病原による植物病害を防除することが不可欠である。

## 【0 0 0 4】

農園芸植物を病害から防除する方法のうち効果的な方法として広く行なわれているものは、農薬（例えば殺真菌剤、殺細菌剤、抗ウイルス剤）を投与する化学的な方法である。近年、有機合成農薬はその効果ゆえに飛躍的な発達で普及し、病害の防除に威力を発揮し農作物の生産向上に大きく貢献してきた。しかし、農薬使用に偏った病害の防除は、農薬の土壌残留、食品残留、病原性微生物の薬剤抵抗性の増大など地球環境的、社会的、農業的に問題がある。また、農薬の過度の使用は農作業者の安全性の面からも問題がある。

## 【0 0 0 5】

かかる問題点は国際的にも重大な関心が寄せられており種々の対策が採られつつある。その一例を挙げれば、土壌くん蒸剤である臭化メチル剤はオゾン層破壊の原因であるとして、2005年にはモントリオール議定書により、一部の使用を除き絶廃され全面的に使用が禁止されることとなっている。

## 【0 0 0 6】

農薬への過度の依存を改めて自然生態系との調和のとれた総合的病害管理体系（Integrate Pest Management = IPM）を確立することは世界的に強く望まれている。

## 【0 0 0 7】

細菌等の微生物の能力を利用して植物病害を防除する方法すなわち、微生物農薬による防除は上記の問題を解決するための有力な手段であると期待される。

## 【0 0 0 8】

この出願の発明に関連する先行技術文献情報としては次のものがある。

【特許文献1】特開昭63-273470号公報

【特許文献2】特開平2-22299号公報

【特許文献3】特開平8-175919号公報

【特許文献4】特開2003-277210号公報

【特許文献5】特開2002-145712号公報

【特許文献6】特開平9-124427号公報

【特許文献7】特開平11-302120号公報

【特許文献8】特開平9-308372号公報

【特許文献9】特許公開平7-267811号公報

【非特許文献1】Phae, C. G., Shoda, M., Kita, N., Nakano, M. および Ushiyama, K. : Ann. Phytopath. Soc. Japan, 58, 329-339, 1992

【非特許文献2】山田昌雄編著：微生物農薬－環境保全型農業をめざして－全国農村教育協会, p. 328, 2000

【非特許文献3】岩田俊一他編：植物防疫講座－病害編－日本植物防疫協会, p. 2

出証特2005-3026880

8 1, 1 9 8 3

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0 0 0 9】

本発明は、植物病原性の細菌、糸状菌またはウイルスが原因となる植物病害を生物的に防除するための防除剤または防除資材、それらを用いた植物病害の防除方法、およびそれらに使用することができる細菌に関する。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0 0 1 0】

本発明は以下の発明を包含する。

(1) 植物病原性の細菌、糸状菌またはウイルスの感染または増殖を抑制する能力を有するバチルス属に属する細菌を含む、植物病害の防除剤または防除資材。

(2) 植物病原性の細菌、糸状菌またはウイルスの感染または増殖を抑制する能力を有するバチルス属に属する細菌がDAIJU-SIID2550 (受託番号FERM P-19591) またはその変異株である (1) に記載の防除剤または防除資材。

(3) 植物病原性細菌がアグロバクテリウム属、クラビバクター属、エルウィニア属、シェウドモナス属、ラルストニア属、コリネバクテリウム属、クルトバクテリウム属、バークホルデリア属またはキサントモナス属に属する細菌であり、植物病害が該細菌による病害である (1) または (2) に記載の防除剤または防除資材。

(4) 植物病原性糸状菌が空気伝染性糸状菌または土壌伝染性糸状菌であり、植物病害が該糸状菌による病害である (1) または (2) に記載の防除剤または防除資材。

(5) 植物病原性ウイルスが、タバコモザイクウイルス、トウガラシマイルドモットルウイルス、トマトモザイクウイルス、メロンえそ斑点ウイルス、スイカ緑斑モザイクウイルスまたはキュウリ緑斑モザイクウイルスであり、植物病害が該ウイルスによる病害である (1) または (2) に記載の防除剤または防除資材。

(6) (1) ~ (5) のいずれかに記載の防除剤または防除資材を植物病原性の細菌、糸状菌またはウイルスの宿主となる植物に施用することを含む植物病害の防除方法。

(7) 植物がアブラナ科、ナス科、ウリ科、ユリ科、マメ科、キク科、アカザ科、イネ科、バラ科、ナデシコ科、サクラソウ科、ミカン科、ブドウ科、マタタビ科、カキ科、セリ科、ヒルガオ科、またはサトイモ科に属する植物である (1) に記載の方法。

(8) 植物への施用方法が、細菌を植物の種子に塗布する処理、細菌を含む懸濁液に植物の種子を浸漬する処理、細菌を植物の栽培土壌に灌注する処理、細菌を植物の栽培土壌に混和する処理、細菌を植物の茎葉に散布する処理、および、細菌を植物の付傷部に接触させる処理からなる群から選択される少なくとも 1 つの処理を含む、(6) または (7) に記載の方法。

(9) 新規バチルス属細菌DAIJU-SIID2550 (受託番号FERM P-19591) 株。

## 【発明の効果】

## 【0 0 1 1】

本発明によれば、植物病原性の細菌、糸状菌またはウイルスの感染または増殖による植物病害を生物的に防除することができる。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0 0 1 2】

本発明は、植物病原性の細菌、糸状菌またはウイルスの感染または増殖を抑制する能力を有するバチルス属に属する細菌を、植物病原性の細菌、糸状菌またはウイルスの宿主となる植物に施用することを含む、植物病害の防除方法に関する。

## 【0 0 1 3】

本発明はまた、植物病原性の細菌、糸状菌またはウイルスの感染または増殖を抑制する能力を有するバチルス属に属する細菌を含む、植物病害の防除剤または防除資材に関する。

。

## 【0 0 1 4】

本発明により、植物病原性の細菌、糸状菌またはウイルスによる植物病害を生物的に防除する方法およびそのための防除剤及び防除資材が提供される。バチルス属に属する細菌により植物病害を防除する方法はこれまでに幾つか開示されているが（上記の特許文献 1～9 および非特許文献 1 及び 2 参照）、本明細書で開示される発明に該当するものは皆無である。

#### 【0015】

本発明により防除される細菌性の植物病害としては、細菌が病原である任意の植物病害が挙げられ、例えば、アグロバクテリウム属、クラビバクター属、エルウィニア属、シュードモナス属、ラルストニア属、コリネバクテリウム属、クルトバクテリウム属、バークホルデリア属、キサントモナス属、リゾバクター属またはクロストリジウム属に属する細菌による植物病害が挙げられる。本発明の防除剤または防除資材は、特に、アグロバクテリウム属、クラビバクター属、エルウィニア属、シュードモナス属、ラルストニア属、コリネバクテリウム属、クルトバクテリウム属、バークホルデリア属またはキサントモナス属に属する細菌による植物病害に対して有効である。より具体的には、例えば、キサントモナス・カンペストリス・パソパー・カンペストリス (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*、本明細書において「黒腐病菌」という) のアブラナ科植物への感染により引き起こされる黒腐病(Black rot)、アグロバクテリウム・リゾゲネス (*Agrobacterium rhizogenes*) のメロンへの感染により引き起こされる毛根病(Hairy root)、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のニンジンへの感染により引き起こされる根頭がんしゅ病(Crown gall)、バークホルデリア・グラジオリ (*Burkholderia gladioli*) のタマネギへの感染により引き起こされるりん片腐敗病、クラビバクター・ミシガネンシス・サブスピーシーズ・ミシガネンシス (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) のトマトへの感染により引き起こされるかいよう病(Bacterial canker)、コリネバクテリウム属細菌 (*Corynebacterium* sp.) のトウガラシ、ピーマンへの感染により引き起こされるかいよう病(Bacterial canker)、コリネバクテリウム属細菌 (*Corynebacterium* sp.) のトマトへの感染により引き起こされる葉こぶ病(Bacterial leaf gall)、クルトバクテリウム・フラクムファシエンス (*Curtobacterium flaccumfaciens*) のタマネギへの感染により引き起こされるかいよう病、エルウィニア・カロトボラ・サブスピーシーズ・カロトボラ (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) のツケナ、サントウサイ、タイサイ、カブ、カリフラワー、キャベツ、キュウリ、ダイコン、パクチョイ、タマネギ、トウガラシ、ピーマン、トマト、ナス、ニラ、ニンジン、ニンニク、ネギ、ハクサイ、ブロッコリー、メロン、レタス (チシャ) への感染により引き起こされる軟腐病(Bacterial soft rot, Slimy soft rot)、エルウィニア・クリサンテミ (*Erwinia chrysanthemi*) のイチゴへの感染により引き起こされる萎凋細菌病(Bacterial stem rot)、エルウィニア・クリサンテミのカボチャへの感染により引き起こされる腐敗病(Bacterial rot)、エルウィニア・クリサンテミのナスへの感染により引き起こされる茎腐細菌病(Bacterial stem rot)、エルウィニア・クリサンテミのネギへの感染により引き起こされる軟腐病(Bacterial soft rot)、エルウィニア・ラポンチシ (*Erwinia rhapontici*) のタマネギへの感染により引き起こされる腐敗病(Soft rot)、エルウィニア属細菌 (*Erwinia* sp.) のニンニクへの感染により引き起こされる春腐病、シュードモナス・チコリ (*Pseudomonas cichorii*) のオクラへの感染により引き起こされる葉枯細菌病、シュードモナス・チコリのナスへの感染により引き起こされる褐斑細菌病(Necrotic leaf spot)、シュードモナス・チコリのニンニクへの感染により引き起こされる春腐病、シュードモナス・チコリのメロン、レタス (チシャ) への感染により引き起こされる腐敗病(Bacterial rot)、シュードモナス・コルガタ (*Pseudomonas corrugata*) のトマト、ナスへの感染により引き起こされる茎えそ細菌病(Pith necrosis)、シュードモナス・フルオレセンス (*Pseudomonas fluorescens*) のトマトへの感染により引き起こされる茎えそ細菌病(Pith necrosis)、シュードモナス・マージナリス (*Pseudomonas marginalis*) のナバナへの感染により引き起こされる花腐細菌病(Bacterial bud rot)、シュードモナス・マージナリス・パソパー・マージナリス (*Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*) のイチゴへの感染により

引き起こされる芽枯細菌病、シュードモナス・マージナリス・パソバー・マージナリスのキャベツ、シュンギク、タマネギ、ネギ、ハクサイ、ブロッコリー、レタス（チシャ）への感染により引き起こされる腐敗病(Soft rot、Head rot)、シュードモナス・マージナリス・パソバー・マージナリスのキュウリへの感染により引き起こされる縁枯細菌病(Marginal blight)、シュードモナス・マージナリス・パソバー・マージナリスのダイコンへの感染により引き起こされる黒点輪腐病、シュードモナス・マージナリス・パソバー・マージナリスのトマトへの感染により引き起こされる腐敗細菌病(Bacterial rot)、シュードモナス・マージナリス・パソバー・マージナリスのニンニクへの感染により引き起こされる春腐病、シュードモナス属細菌(Pseudomonas sp.)のイチゴへの感染により引き起こされる褐色腐敗病、シュードモナス属細菌のトマトへの感染により引き起こされる幼果黒変症状、シュードモナス属細菌のナスへの感染により引き起こされる斑点細菌病(Bacterial spot)、シュードモナス属細菌のニラへの感染により引き起こされる株腐細菌病(Bacterial basal bulb rot)、シュードモナス・シリング(Pseudomonas syringae)のタマネギ、ネギへの感染により引き起こされる斑点細菌病(Bacterial leaf spot)、シュードモナス・シリング・パソバー・ラクリマンズ(Pseudomonas syringae pv. lachrymans)のカボチャ、キュウリ、ニガウリ（ツルレイシ）、メロンへの感染により引き起こされる斑点細菌病(Angular leaf spot、Bacterial spot)、シュードモナス・シリング・パソバー・マクリコラ(Pseudomonas syringae pv. maculicola)のツケナ、サントウサイ、タイサイ、カブ、カラシナ・タカナ、カリフラワー、キャベツ、キョウナ（ミズナ）、ダイコン、ハクサイへの感染により引き起こされる黒斑細菌病(Bacterial leaf spot、Bacterial black spot)、シュードモナス・シリング・パソバー・スピナチエ(Pseudomonas syringae pv. spinaciae)のハウレンソウへの感染により引き起こされる斑点細菌病(Bacterial leaf spot)、シュードモナス・シリング・パソバー・トマト(Pseudomonas syringae pv. tomato)のトマトへの感染により引き起こされる斑葉細菌病(Bacterial speck)、シュードモナス・ビリジフラバ(Pseudomonas viridiflava)のオクラへの感染により引き起こされる葉枯細菌病、シュードモナス・ビリジフラバのキャベツへの感染により引き起こされる腐敗病(Soft rot)、シュードモナス・ビリジフラバのキュウリへの感染により引き起こされる縁枯細菌病(Marginal blight)、シュードモナス・ビリジフラバのトマトへの感染により引き起こされる黒斑細菌病(Bacterial black spot)、シュードモナス・ビリジフラバのナバナへの感染により引き起こされる花腐細菌病(Bacterial bud rot)、シュードモナス・ビリジフラバのハクサイへの感染により引き起こされる褐条細菌病(Bacterial brown streak)、シュードモナス・ビリジフラバのレタス（チシャ）への感染により引き起こされる腐敗病(Bacterial rot)、ラルストニア・ソラナセラム(Ralstonia solanacearum)のイチゴ、カブ、カボチャ、キュウリ、シュンギク、ダイコン、トウガラシ、ピーマン、トマト、ナス、ニガウリ（ツルレイシ）への感染により引き起こされる青枯病(Bacterial wilt)、リゾバクター・ダウチ(Rhizobacter dauci)のニンジンへの感染により引き起こされるこぶ病(Bacterial gall)、キサントモナス・カンペストリス(Xanthomonas campestris)のイチゴへの感染により引き起こされる角斑細菌病、キサントモナス・カンペストリスのシュンギクへの感染により引き起こされる黒腐病、キサントモナス・カンペストリスのブロッコリーへの感染により引き起こされる黒腐病(Black rot)、キサントモナス・カンペストリス・パソバー・アリイ(Xanthomonas campestris pv. allii)のネギへの感染により引き起こされる葉枯細菌病(Bacterial blight)、キサントモナス・カンペストリス・パソバー・カロテ(Xanthomonas campestris pv. carotae)のニンジンへの感染により引き起こされる斑点細菌病(Bacterial blight)、キサントモナス・カンペストリス・パソバー・ククルビタエ(Xanthomonas campestris pv. cucurbitae)のカボチャ、キュウリ、メロンへの感染により引き起こされる褐斑細菌病(Bacterial spot、Bacterial brown spot、Bacterial leaf spot)、キサントモナス・カンペストリス・パソバー・ラファニ(Xanthomonas campestris pv. raphani)のカブ、キャベツ、ダイコン、チンゲンサイ、ハクサイへの感染により引き起こされる斑点細菌病(Bacterial spot)、キサントモナス・カンペストリス・パソバー・ベシカトリア(Xanthomonas campestris pv. vesicator



ia) のトウガラシ、ピーマン、トマトへの感染により引き起こされる斑点細菌病(Bacterial spot)、キサントモナス・カンペストリス・パソバー・ビチナス (*Xanthomonas campestris* pv. *vitians*) のレタス (チシャ)への感染により引き起こされる斑点細菌病(Bacterial spot)、キサントモナス・フラガリエ (*Xanthomonas fragariae*) のイチゴへの感染により引き起こされる角斑細菌病、シュードモナス・シリング・パソバー・オリゼ (*Pseudomonas syringae* pv. *oryzae*) のイネへの感染により引き起こされるかさ枯病 (Halo blight)、イネ褐条病菌 (*Acidovorax avenae* subsp. *avenae*) のイネへの感染により引き起こされる褐条病 (Bacterial brown stripe)、エルウィニア・クリサンテミ・パソバー・ゼア (*Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*) のイネへの感染により引き起こされる株腐病 (Bacterial foot rot)、キサントモナス・オリゼ・パソバー・オリゼ (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) のイネへの感染により引き起こされる白葉枯病 (Bacterial leaf blight)、エルウィニア・アナナス (*Erwinia ananas*) のイネへの感染により引き起こされる内穎褐変病 (Bacterial palea browning)、バークホルデリア・プランタリ (*Burkholderia plantarii*) のイネへの感染により引き起こされる苗立枯細菌病 (Bacterial seedling blight)、バークホルデリア・グルメ (*Burkholderia glumae*) のイネへの感染により引き起こされるもみ枯細菌病 (Bacterial grain rot)、シュードモナス・フスコバジネ (*Pseudomonas fuscovaginae*) のイネへの感染により引き起こされる葉しょう褐変病 (Sheath brown rot)、シュードモナス・シリング・パソバー・ジャポニカ (*Pseudomonas syringae* pv. *japonica*) のコムギへの感染により引き起こされる黒節病 (Bacterial black node)、ラルストニア・ソラナセルム (*Ralstonia solanacearum*) のジャガイモへの感染により引き起こされる青枯病 (Bacterial wilt)、エルウィニア・クリサンテミ・パソバー・クリサンテミ (*Erwinia chrysanthemi* pv. *chrysanthemi*) のジャガイモへの感染により引き起こされる萎凋細菌病 (Bacterial stem rot)、エルウィニア・カロトボーラ・サブスピーシーズ・アトロセプチカ (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*)、エルウィニア・カロトボーラ・サブスピーシーズ・カロトボーラ (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)、エルウィニア・クリサンテミ (*Erwinia chrysanthemi*) のジャガイモへの感染により引き起こされる黒あし病 (Black leg)、エルウィニア・カロトボーラ・サブスピーシーズ・カロトボーラ (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) のジャガイモへの感染により引き起こされる軟腐病 (Bacterial soft rot)、クロストリジウム属細菌 (*Clostridium* sp.) のジャガイモへの感染により引き起こされる粘性腐敗病 (Slimy rot)、クラビバクター・ミシガネンシス・サブスピーシーズ・ゼベドニクス (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*) のジャガイモへの感染により引き起こされる輪腐病 (Ring rot)、キサントモナス・カンペストリス・パソバー・グリシンス (*Xanthomonas campestris* pv. *glycines*) のダイズへの感染により引き起こされる葉焼病 (Bacterial pustule)、シュードモナス・シリング・パソバー・グリシネ (*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*) のダイズへの感染により引き起こされる斑点細菌病 (Bacterial blight)、イネ褐条病菌のトウモロコシへの感染により引き起こされる褐条病 (Bacterial brown stripe)、バークホルデリア・アンドロポゴニス (*Burkholderia andropogonis*) のトウモロコシへの感染により引き起こされる条斑細菌病 (Bacterial stripe)、エルウィニア・クリサンテミ・パソバー・ゼア、シュードモナス・マージナリスのトウモロコシへの感染により引き起こされる倒伏細菌病 (Bacterial stalk rot) が挙げられるがこれらには限られない。

#### 【0016】

黒腐病菌による黒腐病はアブラナ科植物の生産に致命的障害を与える病気として知られており、日本だけでなく世界的な重要病害として、既発生国及び未発生国共にその防除には多大の関心が寄せられている。従来、黒腐病に対しては実用的に認知された抵抗性品種はなく、有効な農薬も開発されていない。本発明によればアブラナ科植物、例えばキャベツ、ハクサイ、ダイコン、ブロッコリー、カリフラワー、カブ、チンゲンサイ、コマツナ、タイサイ、洋種ナタネ、シラクキナ、サントウサイ、アブラナ、コモチカンラン、カブラタマナ(コールラビ)、カイラン、ターサイ、カラシナ、ツケナ、ハボタンにおいて黒腐

病が効果的に防除され得る。

【0017】

イネ籾枯細菌病及びイネ苗立枯細菌病はイネ籾からの種子伝染性病害として水稻栽培上の防除、特に種子消毒が不可欠な重要な細菌性病害である。現在はこちらに対応するため一般的には化学的防除法が実用化されている。しかし、農薬による籾消毒は農薬液の残液処理などが問題を提起している。また籾消毒用の生物農薬としては「モミゲンキ」（日産化学工業株式会社）が市販されているに過ぎない。本発明によれば、水稻の種子伝染性細菌病を効果的に防除することができる。

【0018】

また本発明により防除される糸状菌病としては、病原が糸状菌である任意の植物病害が挙げられ、例えば、空気伝染性糸状菌及び土壌伝染性糸状菌による病害が挙げられる。本明細書において空気伝染性糸状菌には水媒伝染性のものも含まれる。空気伝染性糸状菌としては例えば、うどんこ病菌 (*Erysiphe* 属菌、*Sphaerotheca* 属菌、*Leveillula* 属菌)、ボトリチス (*Botrytis*) 属菌、フルビア (*Fulvia fulva*) 属菌、コリネスポラ (*Corynespora*) 属菌、アルブゴ (*Albugo*) 属菌、べと病菌 (*Pseudoperonospora* 属菌、*Peronospora* 属菌、*Plasmopara* 属菌、*Bremia* 属菌)、いもち病菌 (*Pyricularia grisea*)、ごま葉枯病菌 (*Cochliobolus miyabeanus*)、サーコスボラ類縁菌 (*Cercospora* 属菌 *Cercosporiella* 属菌 *Pseudocercospora* 属菌 *Paracercospora* 属菌 *Mycovellosiella* 属菌)、炭疽病菌 (*Colletotrichum* 属菌、*Glomerella* 属菌)、さび病菌 (*Puccinia* 属菌)、黒斑病菌 (*Alternaria* 属菌)、アルタナリア (*Alternaria*) 属菌が挙げられるがこれらに限定されない。土壌伝染性糸状菌としては例えば、根こぶ病菌 (*Plasmodiophora brassicae*)、フィトフィトラ (*Phytophthora*) 属菌、フザリウム (*Fusarium*) 属菌、バーティシリウム (*Verticillium*) 属菌、ピシウム (*Pythium*) 属菌およびリゾクトニア (*Rhizoctonia*) 属菌が挙げられるがこれらに限定されない。

【0019】

より具体的には、空気伝染性糸状菌病害としては、うどんこ病菌のトマト、ナス、ダイコン、キャベツ、カブ、カラシナ、ハクサイ、コマツナ、ニンジン、キュウリ、イチゴ、トウガラシ、メロン、スイカ、カボチャ、キクへの感染により引き起こされるうどんこ病 (*Powdery mildew*)、ボトリチス・シネリア (*Botrytis cinerea*) のウリ科、ナス科、レタス、豆類、イチゴへの感染により引き起こされる灰色かび病 (*Gray mold*)、コリネスポラ・カッシコラ (*Corynespora cassiicola*) のキュウリへの感染により引き起こされる褐斑病 (*Corynespora leaf spot*)、アルブゴ・マクロスポラ (*Albugo macrospora*) のハクサイ、カリフラワー、カブ、ダイコン、コマツナなど多くのアブラナ科野菜類への感染により引き起こされる白さび病 (*White rust*)、べと病菌のウリ類、アブラナ科野菜類、ネギ・タマネギ、ワサビ、シュンギク、ミツバ、ハウレンソウおよびレタスへの感染により引き起こされるべと病 (*Dawny mildew*)、いもち病菌のイネへの感染により引き起こされるイネいもち病 (*Rice blast*)、シュードサーコスボラ・フリゲナ (*Pseudocercospora fuligena*) のトマトへの感染により引き起こされるトマトすすかび病 (*Cercospora leaf mold*)、パラサーコスボラ・エゲヌラ (*Paracercospora egenula*) のナスへの感染により引き起こされるナス褐色円星病 (*Leaf spot*)、サーコスボラ・カプシシ (*Cercospora capsici*) のピーマン・トウガラシへの感染により引き起こされる斑点病 (*Frogeye leaf spot*)、サーコスボラ・シトルリナ (*Cercospora citrullina*) のキュウリ、メロン、スイカ及びヘチマへの感染により引き起こされる斑点病 (*Leaf spot*)、サーコスボレラ・ブラシカエ (*Cercosporiella brassicae*) のハクサイ及びカブへの感染により引き起こされるハクサイ及びカブ白斑病 (*White spot*)、マイコベロシラ・ナトラスシイ (*Mycovellosiella nattrassii*) のナスへの感染により引き起こされるナスすすかび病 (*Leaf mold*)、炭疽病菌のハクサイ、カブ、ダイコン、コマツナ、サトウダイコン、チンゲンサイ、ツケナ類、インゲン、トウガラシ、ピーマン、ウリ類、エダマメ、ネギ、タマネギ、ニラ、ハウレンソウ、イチゴへの感染により引き起こされる炭疽病 (*anthracnose*)、さび病菌のネギ、タマネギ、ラッキョウ、ニンニク、ニラへの感染により引き起こされるさび病 (*Rust*)、キクへの感染によ

り引き起こされるキク白さび病(Rust)、黒斑病菌のアブラナ科野菜類、ニンジンへの感染により引き起こされる黒斑病(Alternaria leaf spot, Alternaria black rot)、アルタナリア・ブラシキコラ(Alternaria brassicicola)のキャベツへの感染により引き起こされる黒すす病(Alternaria sooty spot)、アルタナリア・ダウシ(Alternaria dauci)のニンジンへの感染により引き起こされる黒葉枯病(Leaf Blight)、アルタナリア・ソラニ(Alternaria solani)のジャガイモへの感染により引き起こされる夏疫病(Early Blight)、アルタナリア・ソラニ(Alternaria solani)のトマトへの感染により引き起こされるトマト輪紋病(Early Blight)、ボトリチス属菌のタマネギ、ニラへの感染により引き起こされる白斑葉枯病(Leaf Blight)、ボトリチス・アリー(Botrytis allii)のタマネギへの感染により引き起こされる灰色腐敗病(gray-mold neck rot)が挙げられるがこれらには限られない。空気伝染性糸状菌による病害の中でも、アブラナ科植物の葉根菜類の生産に致命的障害を与える病気として知られている白さび病、黒斑病、炭疽病、べと病などは日本だけでなく世界的な重要病害として既発生国及び未発生国共においてその対応に多大の関心が寄せられている。従来、白さび病、黒斑病、炭疽病、べと病に対しては実用的に認知された抵抗性品種はない。防除効果の高い農薬はあるが(メタラキシル水和剤、イプロジオン水和剤、TPN水和剤、チオファネートメチル水和剤)、葉や根を直接食用にする葉根菜類を対象とするが故に、適正使用基準が厳しく防除の上で不都合が多い。本発明によればこれらの病害をカブ、チンゲンサイ、コマツナ、タイサイ、ダイコン、カイラン、ターサイ、カリフラワー、ブロッコリー、ハクサイ、キャベツ、アブラナ、カラシナなどにおいて生物的に防除することができる(実施例21及び22を参照)。

#### 【0020】

土壌伝染性糸状菌病害としては、具体的には、根こぶ病菌のアブラナ科作物への感染により引き起こされる根こぶ病、フィトフィトラ属菌のイネ、リンゴ、ユリ、イチゴ、カンキツ、ナス、ピーマン、トウガラシ、カボチャ、サトイモ、ジャガイモ、トマト、ナス、キュウリ、スイカ、メロン、ウリ類、ネギ、カーネーション、カンキツ、ホウレンソウへの感染により引き起こされる疫病、トマト、キュウリへの感染により引き起こされる灰色疫病、ナス、トマト、スイカ、カンキツへの感染により引き起こされる褐色腐敗病、イチゴへの感染により引き起こされる根腐病、イネ、オオムギ、コムギ、エンバク、トウモロコシ、ベントグラス類への感染により引き起こされる黄化萎縮病、バラへの感染により引き起こされる茎腐病、イネ、ダイズ、ナスへの感染により引き起こされる綿疫病、カンキツへの感染により引き起こされるすそ腐病、タマネギ、ネギ、ワケギ、ラッキョウ、ニンニク、ニラ、ノビルへの感染により引き起こされる白色疫病、アズキ、ダイズへの感染により引き起こされる茎疫病、ナスへの感染により引き起こされる苗葉枯疫病、トマト、ナスへの感染により引き起こされる根腐疫病、ピシウム属菌のインゲンマメ、カボチャ、キュウリへの感染により引き起こされる綿腐病、イネ、ナス、トマト、ホウレンソウ、カボチャ、キュウリ、インゲン、エンドウ、オクラ、メロンへの感染により引き起こされる苗立枯病、ニンジンへの感染により引き起こされるしみ腐病、ベントグラス類への感染により引き起こされる赤焼病、ダイズ、キュウリ、メロン、ホウレンソウへの感染により引き起こされる立枯病、コムギ、オオムギ、エンバク、ライムギ、ライグラス類、フェスク類への感染により引き起こされる褐色雪腐病、イチゴ、キュウリ、サトイモ、トマトへの感染により引き起こされる根腐病、サツマイモへの感染により引き起こされる白腐病、イネへの感染により引き起こされる苗腐病、リゾクトニア属菌のイネへの感染により引き起こされる赤色菌核病、イネ、オオムギ、アワ、モロコシ、キビへの感染により引き起こされる紋枯病、ダイズ、アズキ、インゲンマメ、エンドウ、ジャガイモ、オーチャードグラス、ブルーグラス類、フェスク類、ライグラス類、ベントグラス類、ソルガム類への感染により引き起こされる葉腐病、イチゴへの感染により引き起こされる芽枯病、ソラマメ、カーネーションへの感染により引き起こされる茎腐病、イネ、トマト、ナス、ピーマン、トウガラシ、ピーマン、キュウリ、メロン、マクワウリ、ユウガオ、キャベツ、カリフラワー、ブロッコリー、コマツナ、タマネギ、ネギ、オクラ、シクラメンへの感染により引き起こされる苗立枯病、ホウレンソウ、オオムギ、コムギ、キャベツ、への感染により引き

起こされる株腐病、レタスへの感染により引き起こされるすそ枯病、ジャガイモ、ゴボウへの感染により引き起こされる黒あざ病、ダイコン、ニンジンへの感染により引き起こされる根腐病、ハクサイへの感染により引き起こされる尻腐病、ニンジンへの感染により引き起こされる紫紋羽病、キクへの感染により引き起こされる立枯病、バーティシリウム属菌のイチゴ、ウド、ダイズへの感染により引き起こされる萎凋病、ナス、トウガラシ（ピーマン）、トマト、オクラ、キュウリ、フキ、メロン、キク、バラへの感染により引き起こされる半身萎凋病、キャベツ、レタスへの感染により引き起こされるバーティシリウム萎凋病、ダイコンへの感染により引き起こされるバーティシリウム黒点病、ハクサイへの感染により引き起こされる黄化病、フザリウム属菌のナスへの感染により引き起こされる半枯病、キュウリ、ユウガオ、ヘチマ、メロン、スイカ、サツマイモへの感染により引き起こされるつる割病、キャベツ、イチゴ、ダイコン、カブ、キャベツ、コマツナ、ウドへの感染により引き起こされる萎黄病、レタス、インゲンへの感染により引き起こされる根腐病、ラッキョウ、タマネギ、ニンニク、ニラ、サトイモ、ニンジンへの感染により引き起こされる乾腐病、ミツバへの感染により引き起こされる株枯病、ゴボウ、ネギ、トマト、ホウレンソウ、カーネーション、シクラメン、アズキへの感染により引き起こされる萎凋病、アスパラガス、カーネーションへの感染により引き起こされる立枯病、ハスへの感染により引き起こされる腐敗病、メロン、ヤマイモへの感染により引き起こされる褐色腐敗病、トマト、ネギへの感染により引き起こされる根腐萎凋病、イネへの感染により引き起こされる苗腐病、コムギへの感染により引き起こされる紅色雪腐病が挙げられるがこれらには限られない。土壌伝染性糸状菌による病害の中でも、フザリウム属菌、バーティシリウム属菌またフィトフィトラ属菌などによる病害は、難防除病害として野菜栽培の上で致命的障害を与える。そのため、これらの諸病害に対応するため、抵抗性品種の育成、化学的農薬による土壌消毒、発生予察などの手段が講じられてきた。例えば、ナス科（トマト、ナス、ピーマン、シシトウ）、ウリ科（キュウリ、スイカ、メロン）などでは抵抗性品種や抵抗性台木、また化学農薬による土壌消毒（クロールピクリン、ダゾメット、メチルプロマイド）、病原菌の土壌検診などの手段を講じて防除が行われてきた。アブラナ科野菜類、例えばカブ、チンゲンサイ、コマツナ、ハクサイ、キャベツ、ダイコンなどでは、ナス科、ウリ科野菜類に比べて収穫期間が短く、そのため1年間の連作回数が極めて多い。例えばコマツナ、チンゲンサイ、カブでは5～6回である。そのため土壌伝染性病害による被害は致命的である。本発明の防除剤または防除資材を作期ごとに使用することにより、難防除病原菌の土壌中での増殖または伝染を阻止して発病を軽減することができる（実施例23および24参照）。

#### 【0021】

本発明により防除されるウイルス性の植物病害としては、病原がウイルスである任意の植物病害が挙げられ、例えばタバコモザイクウイルス (TMV)、トウガラシマイルドモットルウイルス (PMMoV)、トマトモザイクウイルス (ToMV)、メロンえそ斑点ウイルス (Melon necrotic spot virus: MNSV)、スイカ緑斑モザイクウイルス (Cucumber green mottle mosaic virus: CGMMV)、キュウリ緑斑モザイクウイルス (Kyuri green mottle mosaic virus: KGMMV) による植物病害が挙げられるが、これらには限定されない。

#### 【0022】

より具体的には、タバコモザイクウイルスによるタバコモザイク病、トウガラシマイルドモットルウイルス、トマトモザイクウイルスもしくはタバコモザイクウイルスによるピーマンモザイク病、メロンえそ斑点ウイルスによるメロンえそ斑点病、スイカ緑斑モザイクウイルスによるスイカ緑斑モザイク病、スイカ緑斑モザイクウイルスによるメロン緑斑モザイク病、またはキュウリ緑斑モザイクウイルスによるキュウリ緑斑モザイク病が挙げられるがこれらには限定されない。

#### 【0023】

タバコモザイクウイルス、キュウリ緑斑モザイクウイルス、スイカ緑斑モザイクウイルス、メロンえそ斑点ウイルスによるウイルス病は、いずれも接触感染力、汁液感染力、種子感染力、また土壌感染力が他のウイルスに比べて極めて激しく、世界的な重要ウイルス

病としてその防除には多大の関心が寄せられている。そのため、抵抗性品種や抵抗性台木の育成が行われて実用化されている。しかし、市場や消費者の強い要望が先行し、有力な抵抗性品種や台木が使用されない場合もある。そこで特に汁液伝染、種子伝染、土壌伝染の防止には化学的防除法が適用される。例えばレンテミン水溶剤による汁液伝染防止、第3リン酸ソーダによる種子伝染及び汁液伝染防止、またメチルプロマイドによる土壌伝染防止などである（非特許文献3）。これらの防除法は化学的処理によることもあって、使用法を誤ると効果不十分や薬害の発生または人的被害をこうむる事がある。更に、ウイルス病の土壌伝染防除のために日本ではメチルプロマイド(臭化メチル剤)が広く使用されている。本剤は2005年度にオゾン層の破壊に結びつく理由でモントリオール議定書により使用が禁止される。現在その代替剤の探索が広く行われている。本発明によれば生物的手段により、種子伝染性ウイルス病及び土壌伝染性ウイルス病が効果的に防除されうる（実施例25、26を参照）。

#### 【0024】

本発明に使用され得るバチルス属に属する細菌としては、植物病原性の細菌、糸状菌またはウイルスの感染または増殖を抑制する能力を有するものであれば特に限定されない。例えば、バチルス・アミロリクェファシエンスまたはバチルス・ズブチリスが挙げられる。特に、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されたDAIJU-SIID 2550（受託番号FERM P-19591）が好ましい。この株はバチルス・アミロリクェファシエンス近縁種であると推定されることから、以下「BAL菌」と略記される。BAL菌を含有する植物病害防除剤または防除資材は、植物および土壌への定着性が高く、病害防除活性の持続性が高く、40～100℃の高温に曝されても病害防除活性が維持されるため好ましい。本発明にはまた、BAL菌が変異誘発処理された変異株が用いられ得る。変異誘発処理は任意の適当な変異原を用いて行われ得る。ここで、「変異原」なる語は、その広義において、例えば変異原効果を有する薬剤のみならずUV照射のごとき変異原効果を有する処理をも含むものと理解すべきである。適当な変異原の例としてエチルメタンスルホネート、UV照射、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、プロモウラシルのようなヌクレオチド塩基類似体及びアクリジン類が挙げられるが、他の任意の効果的な変異原もまた使用され得る。

#### 【0025】

上記BAL菌は例えば次の方法により分離される。食用マッシュルーム培養残渣を80℃にて30分間蒸気滅菌し、この残渣：生理食塩水＝1：9（重量比）に希釈し、この希釈液を振幅10cmの往復振とう機を用いて15分間振とうした後、500rpmで5分間低速遠沈して上清を得るか、または、東洋ろ紙No.2でろ過したろ液を採取する。続いて上清またはろ液を0.05%寒天を含む蒸留水で段階希釈する（細菌学実習提案 伝染病研究所学友会 編）。段階希釈は、 $1 \times 10^1 \sim 8$  倍液まで調整し、各希釈液を、径9cmシャーレ中のYPA培地（ペプトン・イースト・食塩培地。植物病原性 微生物研究法 一遺伝子操作を含む基礎と応用 脇本哲 監修を参照されたい）に100μLずつ分注し、25℃の定温器で48～72時間静置培養し、生育した細菌を個別に採取することにより行われる。採種細菌はYPA斜面培地で継代培養される。継代培養された各細菌を、他菌が混合していないかを確認するために再び段階希釈を行い単一コロニーを得る。こうして純粋分離された単一コロニー細菌から、各単一コロニー細菌とカブ萎黄病菌（*Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans*、黒腐病菌に対する抗菌性を確認するための簡易マーカー）とのYPA培地上での対峙培養法で形成される阻止帯の強弱度に基づき、最も阻止力の強い細菌が選別される。

#### 【0026】

こうして選別された細菌は以下の特性を有する。グラム染色性：陽性、内生孢子：有、形態：桿菌、G+C（DNA）割合（mol%）：43.5～44.9（この値はバチルス・ズブチリス（*B. subtilis*）より高い。バチルス・ズブチリスは42～43である）、最適発育温度：25～30℃、バイオセーフティーレベル：レベル1（ヒトに疾病を起こし、動植物に重要な疾患を起こす可能性のないもの）。

#### 【0027】

本細菌の帰属分類群は、16S rDNA (16S rRNA遺伝子) の塩基配列約1600bpを用いて推定した(詳細は下記参考例)。その結果、バチルス属に属する新規株であることが分った。本細菌は、DAIJU-SIID2550として独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに2003年11月20日付けで寄託されている(受託番号FERM P-19591)。

#### 【0028】

本発明に使用されるバチルス属細菌は、往復振とう培養、ジャーファメンター培養、培養タンク培養等の液体培養、固体培養等の通常の培養法により培養されうる。本発明に使用されるバチルス属細菌の培養のための培地は、細菌が効率的に対数増殖期に到達し得るものであれば特に限定されないが、25~30℃、48~96時間以内で生育量が最高に達するものが好ましく、25℃、48時間で生育量が最高に達するものがより好ましい。かかる培地としては例えば、炭素源としてグルコース、シュークロース、デンプン、デキストリン、黒砂糖、フスマ、米糠などの糖類を、窒素源として硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム等のアンモニウム塩、硝酸塩等の無機窒素源、または、酵母エキス、コーン・ステープ・リーカー、肉エキス、小麦胚芽、ポリペプトン、サトウキビ絞り粕(バカス)、ビールカス、大豆粉、米糠、魚粉等の有機窒素源を、無機塩としてリン酸一カリ、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン、硫酸第一鉄等の、リン、カリウム、マンガン、マグネシウム、鉄等を含む塩類を、それぞれ含有する合成または天然の培地が挙げられる。また、振とう培養が行われる場合には必要に応じて消泡剤等の添加剤が加用されてもよい。バチルス属細菌が好気性菌であることから、好气的条件下での培養が好ましく、固体培養または通気攪拌培養、振とう培養等の液体培養が好ましい。また培養温度は、好ましくは10~50℃、より好ましくは15~40℃であり、培養pHは好ましくは5~9、より好ましくは6~8の範囲である。なお実施例5に示すように、上記要件を満たす培養が可能な培地としてオカラ・フスマ・米糠の混合物が好適に使用され得る。これらのものは産業廃棄物であるので、オカラ・フスマ・米糠を培地とする培養は産業廃棄物の有効利用という点で好ましい。

#### 【0029】

本発明による植物病害の防除には、上記バチルス属細菌の培養液がそのまま使用され得るが、好ましくはより防除効果を高めることを目的として培養液を膜分離、遠心分離、濾過分離等の方法により分離した高濃度物が使用され得る。

#### 【0030】

また、本発明には、上記バチルス属細菌の培養液を乾燥させたものが使用され得る。また、上記バチルス属細菌の培養液を遠心分離して得られた上清液を乾燥させたものが使用され得る。また、上記バチルス属細菌の培養液を遠心分離して得られる沈殿菌体を水で洗浄し乾燥させたもの(通常は菌体を約50~100重量%含む)が使用され得る。また、上記バチルス属細菌の培養液を活性炭粉末、珪藻土、タルク等の多孔吸着体に吸着させ乾燥させたもの(通常は菌体を $1 \times 10^8 \sim 10^9$  cfu/g含む)が使用され得る。いずれについても乾燥方法は通常の方法でよく、例えば凍結乾燥、減圧乾燥でよい。これらの乾燥物は乾燥後さらにボールミル等の粉碎手段で粉碎されてもよい。ここで上記乾燥物の調製方法のBAL菌を用いた一例を具体的に示す。AG培地(グルコース(和光純薬工業株式会社)1%、ポリペプトン(日本製薬株式会社)1%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (和光純薬工業株式会社)0.1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (和光純薬工業株式会社)0.05%、pH 7.00、高圧滅菌15分間)100mLを入れた300mL容量の三角フラスコに、BAL菌の斜面培養物を1白金耳植菌した後、25℃で24時間、振とう培養(120回/分)する。続いて、得られた培養物100 $\mu\text{L}$ を上記AG培地100mLに植菌して好气的条件下で25℃にて48時間培養する。この培養液を遠心分離して培養上清と培養沈殿物に分離し、培養上清は採取し、沈殿物は水で洗浄し菌体を得る。または、この培養物を、径1.8cm、高さ10~15cmのガラス管またはプラスチック透明管に詰めた活性炭粉末(和光純薬工業株式会社)、珪藻土(和光純薬工業株式会社)、タルク(和光純薬工業株式会社)等の多孔吸着体に滴下吸着させて菌体を回収する。このようにして得られた培養上清液、水洗浄菌体または吸着菌体を、凍結乾燥または減圧乾燥により乾燥させ、ボールミルで粉碎することで、バチルス属細菌を含む乾燥物が得られる。

## 【0031】

バチルス属細菌は上述の培養液、高濃度物または乾燥物としてそれ自体単独で本発明に使用され得るが、更なる他の任意成分と組み合わせて通常の微生物製剤と同様の形態（例えば粉剤、水和剤、乳剤、液剤、フロアブル剤、塗布剤等の形態）に製剤化されてもよい。組み合わせて使用される任意成分としては例えば固体担体、補助剤が挙げられる。固体担体としては例えばベントナイト、珪藻土、タルク類、パーライト、バーミキュライト、カルボキシメチルセルロースナトリウム（CMC）、ビール粕、サトウキビ絞り粕（バカス）、オカラ、フスマ、キチン、米糠、小麦粉等の有機物粉末が挙げられ、補助剤としては例えばゼラチン、アラビアガム、糖類、ジェランガム等の固着剤や増粘剤が挙げられる。ビール粕、サトウキビ絞り粕（バカス）、オカラ、フスマおよび米糠はいずれも産業廃棄物であるから、これらが本発明に用いられれば産業廃棄物の有効利用という点でも好ましい。ここで、上記バチルス属細菌の培養液とオカラ等の産業廃棄物とが組み合わされた本発明の防除剤または防除資材の一例を具体的に示す。まず、AG培地（グルコース（和光純薬工業株式会社）1%、ポリペプトン（日本製薬株式会社）1%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ （和光純薬工業株式会社）0.1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ （和光純薬工業株式会社）0.05%、pH 7.00、高圧滅菌15分間）100mLを入れた300mL容量の三角フラスコにBAL菌の斜面培養物を1白金耳植菌した後、25℃下で往復振とう培養（120回/分）を行って、BAL菌の菌濃度を $1 \times 10^7$  cfu/mLに調整する。一方で、オカラ1300g、フスマ600g、米糠100gを混合する（以下、この混合物を基本増殖培地と称する）。前記培養液 1mLを基本増殖培地 100mLに植菌し、暗黒下で1日1回の割合で十分攪拌しながら72~120時間静置培養する。静置培養後に乾燥されて本発明の防除剤または防除資材が得られる。こうして得られた防除剤または防除資材中のBAL菌濃度は通常は1g当たり約 $4 \times 10^9 \sim 10^{10}$  cfuである。

## 【0032】

なお上記の通りBAL菌は食用マッシュルーム培養残渣から単離された菌株であるので、BAL菌を含む食用マッシュルーム培養残渣自体もまた本発明の防除剤または防除資材として使用され得る。また食用マッシュルーム培養残渣は、必要に応じて乾燥され粉碎されていてもよい。食用マッシュルーム培養残渣またはその乾燥物中の菌体濃度が低い場合は、その残渣中にBAL菌の上記培養液、高濃度物、乾燥物等が適宜添加されてもよい。このとき、残渣中の最終的なBAL菌濃度が $1 \times 10^9 \sim 10^{10}$  cfu/mL以上となるように添加されるのが好ましい。

## 【0033】

BAL菌を産業廃棄物に繁殖させたものもまた本発明の防除剤または防除資材として使用され得る。かかる形態の防除剤または防除資材としては、コムギフスマ、イナワラ、ムギワラ及びトウモロコシガラまたは使用済菌床（キノコ類培養残渣、例えば食用マッシュルーム培養残渣）などにBAL菌を繁殖させたものが挙げられる。本発明のこの形態は、産業廃棄物の有効利用という点からも好ましい。こうして得られる防除剤または防除資材中のBAL菌濃度は、配合材料にもよるが、通常は $1 \times 10^7 \sim 10^8$  cfu/gである。なお、使用し得る産業廃棄物中のC/N比は、イナワラでは70%、ムギワラでは70~90%、トウモロコシガラでは80~90%である。

## 【0034】

ここで上記の形態の本発明の一例を具体的に説明する。コムギフスマ：ムギワラ（5~10cm切断）：水を1：1：1の割合で配合し、攪拌したのち、米ヌカ（チッソ量1.7~2.0%）を配合物100kgに対し5~10kg、好ましくは5~6kg加える。配合物を降雨があたらない屋内に堆肥作りと同じ要領で積み込み、発酵熱が出始めてから6~7日後に、AG培地で培養したBAL菌液（通常は菌体 $1 \times 10^7 \sim 10^9$  cfu/ml）500mlを均一に散布し攪拌、さらに堆積する。その後、切り返しを4~6日ごと、好ましくは4~5日ごとに5~6回行う。発酵が終了した時点で乾燥させて、BAL菌を含む防除資材が得られる。資材完成時の肥料成分と特性値の分析値は配合材料により変動するものであるが、通常、pHは7.0~7.5、水分含量35~40%、Nは2.5~3.0%、 $\text{P}_2\text{O}_5$ は3.5~4.0%、 $\text{K}_2\text{O}$ は2.0~2.5%、CaOは1.0%、MgOは1.0~1.5%、有機物は50~60%、C/N比は0.7~1.3である。本資材を使用するに際しては更に、簡易ソー



ラー法（太陽エネルギーを利用して日中、地表下15cmで内部温度30～40℃、地表面温度35～40℃になるよう地表面を透明マルチングし、土壤水分70～80%で7～10日間処理する方法）を併用して行ってもよい。本発明の防除資材は、特に土壤伝染性の細菌、糸状菌またはウイルスの宿主への侵入または感染を抑制する効果に優れる。土壤伝染性ウイルスを土壤中で効果的に防除できる（実施例25）ことから、臭化メチル土壤くん蒸剤の代替資材として特に有用である。

#### 【0035】

上記バチルス属細菌の、植物への施用方法は、防除しようとする植物病害の種類、植物病害の発生状況、施用対象である植物の種類、バチルス属細菌の剤形などの諸条件に応じて適宜選択され、例えば、地上部散布、施設内施用、土壤混和施用、土壤灌注施用、表面処理（種子粉衣処理、種子塗布処理）等の各処理により行われ得る。このように本発明の防除剤または防除資材は種子伝染防除法、土壤伝染防除法、空気（水媒）伝染（風・水による伝染）防除法（細菌性植物病害の防除法は一般的にこれらの3分類に大別できる）のいずれの方法にも使用され得る。より具体的な施用方法としては、各種剤形の上記バチルス属細菌を植物の種子に塗布する処理、植物の栽培土壤に灌注する処理、植物の栽培土壤に混和する処理、植物の茎葉に散布する処理、および、植物の付傷部に接触させる処理からなる群から選択される少なくとも1つの処理が行われることが好ましい。バチルス属細菌を植物の種子に塗布する処理は、例えばジェランガム、寒天、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどの被膜形成剤を含む溶液にバチルス属細菌を懸濁させた液を植物種子に塗布した後に乾燥させるか、または、同様の懸濁液に植物の種子を浸漬させた後に乾燥させることにより行われ得る。

#### 【0036】

更にまた、上記バチルス属細菌の植物への施用に際しては、必要に応じて通常使用される他の有効成分、例えば殺虫剤、殺線虫剤、殺ダニ剤、除草剤、殺真菌剤、殺細菌剤、抗ウイルス剤、肥料、土壤改良剤（泥炭等）、を混合施用するか、または、混合せずに交互施用もしくは同時施用することも可能である。本発明に使用されるバチルス属細菌の作用は、殆どの場合、実施例に示される通り、並行して施用される他の有効成分により妨げられない。

#### 【0037】

本発明におけるバチルス属細菌の植物への施用量は、防除される植物病害の種類、植物病害の発生状況、施用対象である植物の種類、バチルス属細菌の剤形などの諸条件に応じて適宜決定される。例えば、BAL菌を含む液剤を黒腐病に罹患した植物の地上部に散布する場合は、液剤中のBAL菌の生細胞濃度は通常約 $1 \times 10^7 \sim 10^9$  cfu/mL、好ましくは約 $1 \times 10^8 \sim 10^9$  cfu/mLであり、その液剤の施用量は好ましくは100～250L/10aである。また、BAL菌を含む乾燥粉剤を黒腐病菌で汚染された栽培土壤に混和する場合は、乾燥粉剤中のBAL菌の生細胞濃度は通常 $1 \times 10^8 \sim 10^{10}$  cfu/g、好ましくは $1 \times 10^9$  cfu/gであり、その乾燥粉剤の施用量は好ましくは500～2000kg/10a、より好ましくは500～1000kg/10aである。なお、BAL菌含有防除剤または防除資材を上記施用量により黒腐病菌で汚染された栽培土壤に十分攪拌して混和し、土壤水分約30～40%、地温20～30℃で土壤が乾燥しないように注意しながら5～7日間放置した後であれば、アブラナ科植物の種子を播種しても黒腐病に罹患することはない。

#### 【0038】

##### 参考例：DAIJU-SIID2550の帰属分類群の検討

DAIJU-SIID2550をCM3Agar(Oxoid, 英国)に植菌し、30℃で2日間培養した。その後、この菌体をDNA抽出の供試菌体とした。ゲノムDNAの抽出にはPrepMan法(Applied Biosystems, 米国)を使用した。抽出したゲノムDNAを鋳型とし、PCRにより16S Ribosomal RNA遺伝子(16S rDNA)の全塩基配列1500～1600bpの領域を増幅した。その後、増幅された16S rDNAをシーケンシングし、検体の16S rDNA塩基配列を得た。PCR産物の精製、サイクルシーケンシングには、MicroSeqFull 16S rDNA Bacterial Sequencing Kit(Applied Biosystems, 米国)を使用した。サーマルサイクラーにはGeneAmp PCR System 9600(Applied Bi



osystems、米国)、DNAシーケンサーにはABI PRISM 3100 DNA Sequencer(Applied Biosystems、米国)を使用し、得られた塩基配列断片の結合にはAutoAssembler2.1(Applied Biosystems、米国)を使用した。なお、ゲノムDNA抽出からサイクルシーケンスまでの基本的操作はApplied Biosystems社のプロトコール(P/N4308132Rev.A)に従った。

#### 【0039】

得られた16S rDNAの塩基配列(配列番号1)を用いて相同性検索を行い、相同率の上位10株を決定した。更に、検索された上位10株と検体の16S rDNAを用いて近隣結合法により分子系統樹を作製し、検体の近縁種および帰属分類群の検討を行った。相同性検索および系統樹の作製にはMicroSeq Microbial Identification System Software V.1.4.1を用い、相同性検索を行う際のデータベースはMicroSeq Bacterial Full Gene Library v.0001(Applied Biosystems、米国)を使用した。

#### 【0040】

また、MicroSeq Bacterial Full Gene Libraryに対する相同性検索において相同率100%で一致する菌株が検索されない場合には、BLASTを用いてDNA塩基配列データベース(Gen Bank/DDBJ/EMBL)に対して相同性検索を行った。

#### 【0041】

MicroSeq Bacterial Full Gene Libraryを用いた解析の結果、*Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. mojavensis*との相異性はそれぞれ0.45%、0.65%、0.71%であり、完全に一致する菌株は検索されなかった。分子系統樹上では本菌株の16S rDNAは*Bacillus amyloliquefaciens*とクラスターを形成し近縁であることが示された。BLASTを用いたGenBank/DDBJ/EMBLに対する相同性検索の結果、*Bacillus* sp. Bchl株(A F411118)に対して最も高い相同性(99.7%)を示したが完全に一致するものは検索されなかった。

#### 【0042】

以上の結果から、DAIJU-SIID2550(受託番号FERM P-19591)株は新規のバチルス属細菌であることが示された。

#### 【0043】

以下に、BAL菌を用いた植物病害防除に関する実施例を記載する。

#### 【実施例1】

#### 【0044】

#### BAL菌の最大増殖時間の検索

独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにDAIJU-SIID2550として寄託されたバチルス・アミロリクエファシエンス近縁種(受託番号FERM P-19591)(以下BAL菌と呼称)1白金耳を滅菌水9mLに懸濁させ、この懸濁液100 $\mu$ Lを、300mL容量の三角フラスコに入れた100mLのAG培地(グルコース(和光純薬工業株式会社)1%、ポリペプトン(日本製薬株式会社)1%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(和光純薬工業株式会社)0.1%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(和光純薬工業株式会社)0.05%、pH 7.00、高圧滅菌15分間)、または、100mLの2%ショ糖加用ジャガイモ煎汁液体培地(ジャガイモ200gを賽の目に切り、約1Lの蒸留水を加えて30分~40分弱火で煮沸し、二重のガーゼでろ過する。ろ液に2%ショ糖を加えたのち蒸留水で1Lとする。以下PS培地と呼称)に添加し、振幅10cm、120回/分の往復振とう機を用いて、25℃で144時間振とう培養した。培養開始後0時間、24時間、48時間、72時間、144時間の各時点において培養液1mLを採取した。採取された培養液試料を9mLの滅菌水に加え、良く攪拌して10倍希釈液を調製した。その後順次、試料を1mL採取して9mLの滅菌水に入れる操作を繰り返し、10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup>倍希釈液を調製した(10倍段階希釈法)。各希釈液を、径9cmシャーレ中のYPA培地(ペプトン・イースト・食塩培地)に100 $\mu$ Lずつ分注し、コーンラージ棒で均一に塗布し25℃で72時間培養した後、生じたコロニー数を調査することにより、各培養時間におけるBAL菌数(相対値)を求めた(表1)。最大増殖時間は48時間または72時間であった。このことからBAL菌と黒腐病菌とを共存させて培養した場合には、培養後48~72時間後に最大の防除効果が得られるものと期待される。

#### 【0045】

【表 1】

培養時間 (時間)	0	24	48	72	144
AG 培地	1	5,000	85,000	74,000	63,000
PS 培地		—	74,000	124,000	115,000

※培養開始時の菌数 (cfu/mL) を 1 とした時の各培養時間における菌数を相対値で示した。

## 【実施例 2】

【0046】

BAL 菌による黒腐病菌の増殖抑制

BAL 菌を YPA 斜面培地から 1 白金耳かき取り、300mL 容三角フラスコに入れた AG 培地 100mL に接種し、振幅 10cm、120 回/分の往復振とう機を用いて 25℃ で 48 時間振とう培養した。この培養液に黒腐病菌懸濁液を 100  $\mu$ L 接種し、同様の条件で更に 48 時間振とう培養した。ここで使用した黒腐病菌懸濁液は、2% ショ糖加用ジャガイモ煎汁寒天培地 (以下 PSA) 斜面培地で培養した黒腐病菌を 1 白金耳かき取り滅菌水 9mL に懸濁して調製したものである。対照実験 (無処理区) として、BAL 菌を接種していない AG 培地 100mL に黒腐病菌懸濁液を 100  $\mu$ L 接種して同様に 25℃ で 48 時間振とう培養した。各培養液をそれぞれ段階希釈法 (実施例 1 参照) により希釈し、各希釈倍率 (10 万倍、100 万倍、1000 万倍) につき 100  $\mu$ L ずつ径 9cm の YPA 平板培地に塗布し、25℃ で 72 時間培養し、生育した黒腐病菌のコロニー数を計測した。72 時間培養後のコロニー (左: 100 万倍、右: 1000 万倍希釈) の様子を図 1 に示す。図 1 中、上段が黒腐病菌のみを培養したもの、下段が黒腐病菌と BAL 菌とを共存させて培養したものである。黒腐病菌コロニー数計測結果を表 2 に示す。このように、黒腐病菌を BAL 菌と共に 25℃ で 48 時間振とう培養したとき、黒腐病菌の増殖は完全に抑制された。

【0047】

【表 2】

黒腐病菌コロニー数

希釈倍数	BAL 菌混合 AG 培地使用	AG 培地使用
10 万倍	0	744
100 万倍	0	136
1000 万倍	0	48

## 【実施例 3】

【0048】

黒腐病菌人工汚染種子の作成

チンゲンサイ種子 (品種 冬賞味) 34g をガーゼで包み、150 倍に希釈したケミクロン G (中性次亜塩素酸カルシウム 有効塩素 70%) 溶液 500mL に 10 分間浸して種子を消毒した。消毒後、種子を流水で 1 時間洗浄し、水分を取り除いたあと、35℃ で一夜乾燥させた。一方、黒腐病菌をあらかじめ 5 枚の PSA 平板培地で 3 日間培養しておき、発育した菌を全てかきとって蒸留水 100mL に懸濁し菌濃度  $1 \times 10^{12}$  cfu/mL の黒腐病菌液を調製した。上記消毒種子 17g を黒腐病菌液に 20 分間浸漬し、35℃ で一夜乾燥させて人工汚染種子を作成した。人工汚染種子の汚染程度を確認したところ、汚染菌量は汚染種子 1 粒あたり  $10^5 \sim 10^6$  cfu であり、全処理種子汚染率は 100% であった。また汚染種子を滅菌土に播種したところ、高率で子葉に病斑があらわれた (図 2)。図 2 左側は、無処理種子 (対照実験) を播種した結果、右側が黒腐病菌人工汚染種子を播種した結果である。

## 【実施例 4】

【0049】

黒腐病菌人工汚染種子に対するBAL菌コート処理の効果

黒腐病菌人工汚染種子に対する処理は以下のように行った。1) 0.5%ジェランガム (S COTT LABORATORIES, INC.,) 水溶液50mL、または、2) 1.5%寒天(和光純薬工業株式会社)水溶液50mLに、あらかじめYPA平板培地2枚で培養したBAL菌を懸濁させ、マグネチックスターラーで均一に攪拌した。この懸濁液50mL中に、実施例3で得られた黒腐病菌人工汚染種子300mgを浸漬し一夜静置したあと取り出して風乾した。対照実験(無処理区)としてBAL菌を混合していない0.5%ジェランガム水溶液50mLまたは1.5%寒天水溶液50mL中に黒腐病菌人工汚染種子を同様に浸漬し、風乾した。風乾後の種子をそれぞれYPA平板培地に置床し、25℃で72時間培養し、種子の周りに黒腐病菌が生育したか否かを調査した。調査結果をもとに、各処理区の被害を次式、

被害=黒腐病菌が周囲に生育した種子の数/置床した種子の総数  
により算出した。この被害をもとに、次式により防除価を算出した。

防除価 =  $100 - (\text{処理区の被害} / \text{無処理区の被害}) \times 100$

【0050】

結果を表3に示す。BAL菌を黒腐病菌人工汚染種子にコートさせた場合、種子に付着した黒腐病菌の増殖を抑制することができた。すなわち、BAL菌により黒腐病菌に汚染された種子を消毒することが可能である。

【0051】

【表3】

	防除価
1) BAL 菌懸濁ジェランガム水溶液によるコート処理	100
2) BAL 菌懸濁寒天水溶液によるコート処理	100

【実施例5】

【0052】

BAL菌のオカラを培地とする培養

105℃で20分間滅菌したオカラ100mLに対して  $1 \times 10^7$  cfu/mLのBAL菌培養液1mLを混和し、暗黒下、25℃で48時間培養しBAL菌オカラ培養物を得た。このBAL菌オカラ培養物500mgを滅菌水9mLに懸濁し、実施例1と同様の10倍段階希釈法により得られた各希釈液100  $\mu$ Lを径9cmシャーレ中のYPA培地にコーンラージ棒で均一に塗布し、BAL菌オカラ培養物のBAL菌菌数を測定した。また、BAL菌オカラ培養物の一部をとり100℃で一夜乾燥させ、含水率を求めた。BAL菌オカラ培養物中のBAL菌菌数は  $4.3 \times 10^9$  cfu/gであり、含水率は87.6%であった。

【0053】

この実験からBAL菌は産業廃棄物であるオカラを培地として増殖させることができることが確認された。また、本実施例で得られた、BAL菌オカラ培養物を乾熱乾燥させたものは、適度な菌体濃度と含水率を有しているため、BAL菌を含有する本発明の防除剤または防除資材の調製のための種菌として使用できる。

【実施例6】

【0054】

黒腐病菌人工汚染種子に対するBAL菌オカラ培養物粉末コート処理の効果

実施例5で得られたBAL菌オカラ培養物(水分含量87%)を35℃で一夜乾燥させ、ボールミルで粉碎してBAL菌オカラ培養物粉末とした。1) 0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム(以下CMC、和光純薬工業株式会社)水溶液50mL、または、2) 0.5%ジェランガム水溶液50mLにそれぞれBAL菌オカラ培養物粉末を500mg加え、10分間マグネチックスターラーで攪拌した。黒腐病菌人工汚染種子300mgをガーゼで包み10分間各液に浸漬し、十分に種子表面に付着させ、35℃で一夜乾燥させた。こうしてBAL菌オカラ培養物粉末コ

ート処理種子を調製した。対照実験（無処理区）として、BAL菌オカラ培養物粉末を添加していない0.5%CMC水溶液または0.5%ジェランガム水溶液に黒腐病菌人工汚染種子を浸漬し、乾燥させた。

#### 【0055】

また3) 上記のBAL菌オカラ培養物粉末2mgを黒腐病菌人工汚染種子200mg、0.5%CMC水溶液16 $\mu$ Lとともに混合した（粉衣処理）。

#### 【0056】

上記処理種子をNSCAA培地（Randhawa, P. S. and Schaad, N. W. (1984). Phytopathology 74: 268-272.）に20粒ずつ置床して25℃で72時間培養し、種子の周りに黒腐病菌が生育するか否かを調査した。上記実験1)～3)のうち1)および2)について、培養後の様子を図3に示す。図3中、左端から、CMC水溶液による処理区「1) 無処理区」、BAL菌オカラ培養物粉末混合CMC水溶液による処理区「1) 処理区」、ジェランガム水溶液による処理区「2) 無処理区」、BAL菌オカラ培養物粉末混合ジェランガム水溶液による処理区「2) 処理区」。

#### 【0057】

周囲に黒腐病菌が生育した種子の数を調査して「被害」を算出し、「防除価」を求めた。「被害」および「防除価」は実施例4で定義した通りである。

#### 【0058】

結果を表4に示す。1)～3)いずれの実験においても黒腐病菌の防除が確認された。すなわち、BAL菌オカラ培養物粉末を黒腐病菌人工汚染種子にコートすることにより、種子に付着した黒腐病菌の増殖を抑制することができた。コート補助剤としてはジェランガムよりもCMCが適していることが判明した。この結果から、BAL菌オカラ培養物粉末をCMC水溶液と混合したものを黒腐病菌人工汚染種子にコートすることにより黒腐病菌の種子伝染が阻害できることが示された。

#### 【0059】

##### 【表4】

	防除価
1) BAL 菌オカラ培養物粉末混合 CMC 水溶液による処理	84.2
2) BAL 菌オカラ培養物粉末混合ジェランガム水溶液による処理	25.0
3) BAL 菌オカラ培養物粉末による処理（粉衣処理）	60.0

#### 【実施例7】

#### 【0060】

##### (1) 食用マッシュルーム培養残渣の調製

食用マッシュルーム培養残渣を次の手順により調製した。

切断した生稲藁を食用マッシュルーム栽培一ヶ月前に準備した。C/N比70%前後になるように大豆粕、米糠を補充し、適当な幅と高さに積み上げた。5日おきに散水しながら、腐熟するまで4回切返して堆肥とした。

#### 【0061】

こうして得られた堆肥を栽培室で15～18cmの厚さにし、菌床とした。この菌床の温度が24℃に下がったところで種菌（アガリスのホワイト種）を植えつけ、温度16℃、湿度96%、炭酸ガス3000ppmの条件下で食用マッシュルームを栽培した。種菌植付け1週間後、菌床表面に菌糸が伸びたところで、大豆粉碎物を菌床全面に敷き、ロータリーで攪拌した。2週間後、ブラックピートモスを1m<sup>2</sup>当り88kgのせた。種菌を植付けてから60日後に食用マッシュルームを収穫し、収穫後の廃床を80℃で30分間消毒した。こうして、食用マッシュルーム培養残渣を得た（なお、種菌としてアガリスのブラウン種を用いてもよく、マッシュルームの収穫は種菌を植付けてから60～90日後の適当な時期に行えばよい）。

#### 【0062】

## (2) 黒腐病菌汚染土壌中の黒腐病菌に対する増殖抑制試験

滅菌土に黒腐病菌を接種して黒腐病菌汚染土（黒腐病菌  $1 \times 10^{12}$  cfu/mL）を調製した。この黒腐病菌汚染土を25℃で1日静置後、この黒腐病菌汚染土1L当たり50gの割合で（10a当たり2,000kgの割合に相当）、上記の食用マッシュルーム培養残渣を混和し、25℃で5日間静置後、土壌中の黒腐病菌数を調査した。対照実験（無処理区）として、黒腐病菌による土壌汚染後、食用マッシュルーム培養残渣を混和しない土壌についても同様に黒腐病菌数を調査した。

## 【0063】

土壌中の黒腐病菌数の測定は次の手順で行った。すなわち、300メッシュのふるいを用いてふるった土壌20gを生理食塩水（0.85% NaCl）80mL中に加えて懸濁液を得、この懸濁液を、振幅10cm、120回/分の往復振とう機を用いて30分間振とうさせ、続いて500rpmで5分間遠心分離した。遠心分離後の上清を0.05% 寒天を含む蒸留水で10倍段階希釈した後、希釈液500 $\mu$ LをNSCAA培地（Randhawa, P. S. and Schaad, N. W. (1984). *Phytopathology* 74: 268-272.）に滴下し、コーンラージ棒で均一に塗布し、25℃で培養後、黒腐病菌に特有の形状を示すコロニー数を調査し、黒腐病菌数を求めた。

## 【0064】

乾土1g当たりの黒腐病菌数は、食用マッシュルーム培養残渣を混合した場合（処理区）では $1.09 \times 10^7$  cfu、食用マッシュルーム培養残渣を混和しない場合（無処理区）では $7.06 \times 10^7$  cfuであった。

## 【0065】

次式、

防除価 =  $100 - (\text{処理区の黒腐病菌数}) / (\text{無処理区の黒腐病菌数}) \times 100$   
により防除価を算出したところ、84.6%であった。結果を表5にまとめる。

## 【0066】

この試験結果から、上記の食用マッシュルーム培養残渣を土壌混和施用することで、黒腐病菌の増殖を有意に抑制できることがわかる。

## 【0067】

## 【表5】

	黒腐病菌数 (cfu/g 乾土)	防除価 (%)
処理区	$1.09 \times 10^7$	84.6
無処理区	$7.06 \times 10^7$	—

## 【実施例8】

## 【0068】

黒腐病菌人工汚染種子に対するBAL菌培養液浸漬処理の効果、および、播種培土に食用マッシュルーム培養残渣混合処理した場合の黒腐病発生抑制効果

BAL菌をAG培地に接種し7日間振とう培養して菌濃度が $1 \times 10^6$  cfu/mLとなったBAL菌培養液に、黒腐病菌人工汚染種子200mgをガーゼで包み一定時間浸漬した。浸漬時間は10分間、20分間、40分間、60分間とした。浸漬後は種子の水気を切り、広げて35℃で一夜乾燥させた。また比較のために、BAL菌を接種していないAG培地に黒腐病菌人工汚染種子を同時間浸漬し、乾燥させた。

## 【0069】

上記処理を施した種子を播種する培土として、蒸気土壌消毒機SB-150（株式会社丸文製作所）を使用して100℃で30分間処理した殺菌土（以下「殺菌土」）、および、食用マッシュルーム培養残渣（実施例7（1）参照）を殺菌土に2000kg/10aの割合で混合したもの（以下「食用マッシュルーム培養残渣混合土壌」、をそれぞれ用意した。これらの培土各150mLを密閉可能な容器に入れ、上記処理を行った黒腐病菌人工汚染種子を20粒播種し、25℃で管理した。

また無処理区として、黒腐病菌人工汚染種子を殺菌土に播種した試験区を用意した。

#### 【0070】

播種後9日目の様子を図4および図5に示す。図4の上段は「BAL菌接種AG培地浸漬+食用マッシュルーム培養残渣混合土壌」の条件での栽培結果、下段は「BAL菌接種AG培地浸漬+殺菌土」の条件での栽培結果（上下段とも左端から浸漬時間10分間、20分間、40分間、60分間）である。図5左端は、「無接種AG培地浸漬+殺菌土」の条件での栽培結果、中央は「BAL菌接種AG培地浸漬+殺菌土」の条件での栽培結果、右端は「BAL菌接種AG培地浸漬+食用マッシュルーム培養残渣混合土壌」の条件での栽培結果である（3者とも浸漬時間は60分間）。

#### 【0071】

播種後9日目に子葉に現れる黒腐病の病徴を調査した。調査は発病指数を以下の6段階に分けて行った。上段は

発病指数0：病徴なし

発病指数1：病斑面積が子葉の半分以下

発病指数2：病斑面積が子葉1枚分

発病指数3：病斑面積が子葉1.5枚分

発病指数4：病斑面積が子葉2枚分

発病指数5：枯死株

#### 【0072】

調査結果から次式、

$$\text{発病度} = (1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4 + 5n_5) / (5 \times \text{調査個体総数})$$

により発病度を算出した。なお、式中の文字  $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$ 、 $n_4$ 、 $n_5$  はそれぞれ、発病指数1、2、3、4、5を示した個体数を表す。

#### 【0073】

算出された発病度から次式、

$$\text{防除価} = 100 - \text{処理区の発病度} / \text{無処理区の発病度} \times 100$$

により防除価を算出した。各処理区の防除価を表6に示す。表6からわかるように、黒腐病菌人工汚染種子をBAL菌培養液に浸漬することにより、黒腐病の発生が抑えられた。また、食用マッシュルーム培養残渣混合土壌を使用した試験区については、BAL菌培養液への浸漬時間が短い試験区（例えば10分間）であっても、BAL菌接種AG培地に60分間浸漬した種子を殺菌土に播種した場合とほぼ同等の防除価が得られた。

#### 【0074】

【表 6】

各処理区の防除価				使用した土壌	
使用した浸漬液	BAL 菌接種 AG 培地	浸漬時間	10 分	殺菌土	マッシュルーム培養残渣混合土壌
			20 分	20.7	60.3
			40 分	38.2	71.6
			60 分	56.2	75.8
	AG 培地	浸漬時間	60 分	74.6	78.8
			10 分	2.7	30.1
			20 分	-7.5※	32
			40 分	-13.2※	20.8
			60 分	-7.5※	41.8

※防除価が負の値の試験区は発病度の数値がコントロールより大きかったことを示す

## 【実施例 9】

## 【0075】

## BAL 菌培養液の地上部散布による黒腐病防除

4 葉期のチンゲンサイ(品種 冬賞味)9株の葉に、AG 培地中で振とう培養したBAL 菌培養液(菌濃度 $3 \times 10^8$  cfu/mL)を霧吹きで300mL散布した。1 時間ほど静置した後、黒腐病菌液を霧吹きで300mL噴霧接種した。この黒腐病菌液は、あらかじめ5枚のPSA平板培地で培養した黒腐病菌を全てかきとり、蒸留水150mLに懸濁して黒腐病菌濃度 $10^8$  cfu/mLの接種用黒腐病菌液としたものである。接種後の植物を温室(湿度80%)に入れ、20℃で管理した。また比較のために、BAL 菌培養液を噴霧接種したのち黒腐病菌を接種しない試験区、および、BAL 菌培養液を噴霧していないチンゲンサイ9株に同濃度の黒腐病菌液を噴霧接種した試験区(無処理区)、を用意した。実験開始後26日目の地上部を図6に示す。図6において、左1列は「BAL 菌接種+黒腐病菌無接種」、中1列は「BAL 菌接種+黒腐病菌接種」(処理区)、右1列は「BAL 菌無接種+黒腐病菌接種」(無処理区)の栽培結果である。発病調査は33日後に葉に現れた黒腐病の病徴の有無を評価することで行った。まず発病葉率(調査葉枚数に占める発病葉枚数の割合)を求め、続いて次式

$$\text{防除価} = 100 - (\text{処理区の発病葉率} / \text{無処理区の発病葉率}) \times 100$$

により防除価を算出した。結果を表7に示す。BAL 菌を黒腐病菌接種前にあらかじめ噴霧処理しておくで黒腐病の発病が抑制された。この結果から、BAL 菌培養液を黒腐病菌宿主の地上部に予防散布することで黒腐病の発病と伝染が抑制できることがわかる。

## 【0076】

## 【表 7】

	BAL 菌	黒腐病菌	防除価
無処理区	無接種	接種	—
処理区	接種	接種	58.6

## 【実施例 10】

## 【0077】

BAL菌に対する慣行的な殺菌剤または殺虫剤の影響

慣行的な殺菌・殺虫剤であるアミスター20フロアブル(シンジェンタ、アゾキシストロビン水和剤)・ジマンダイセン水和剤(ディーエーエス菱商、マンゼブ剤)、ロブラール水和剤(八洲化学、イプロジオン水和剤)、リゾレックス水和剤(住友化学、トルクロホスメチル水和剤)、スターナ水和剤(住友化学、オキシリニック酸水和剤)、ダコニール1000フロアブル(エスディーエス、TPN水和剤)、Zボルドー(日本農薬、銅水和剤)、ベンレート水和剤(住友化学、ベノミル水和剤)、リドミルMZ水和剤(シンジェンタ、マンゼブ・メタラキシル水和剤)、ベストガード水溶剤(住化武田、ニテンピラム水溶剤)、DDVP乳剤(日本農薬、DDVP乳剤)、アフーム乳剤(シンジェンタ、エマメクチン安息香酸塩乳剤)、アドマイヤー水和剤(バイエルクロップサイエンス、イミダクロプリド水和剤)、ランネート45水和剤(三共アグロ、メソミル水和剤)、パダンSG水溶剤(住化武田、カルタップ水溶剤)、モスピラン水溶剤(日本曹達、アセタミプリド水溶剤)、エルサン乳剤(日産化学、PAP乳剤)、アクタラ顆粒水溶剤(シンジェンタ、チアメトキサム水溶剤)、コテツフロアブル(日本農薬、クロルフェナピル水和剤)、トレボン乳剤(三井化学、エトフェンプロックス乳剤)をそれぞれ所定の濃度に希釈した薬液を調製し、この薬液にろ紙(東洋濾紙No.2)を浸漬し乾燥させた。続いてこのろ紙に、BAL菌を蒸留水に懸濁( $2 \times 10^8$  cfu/mL)させた懸濁液を1平方センチメートル当たり44 $\mu$ L噴霧し、再び乾燥させ、25℃、暗黒条件で一晩静置させた。このろ紙を5~10ミリメートル角に切りYPA培地上で25℃暗黒条件で培養した。

## 【0078】

培養3日後及び4日後に、YPA培地上に置床した10ミリメートル角の濾紙片の周囲に生育するBAL菌を観察した。

## 【0079】

その結果を表8に示す。また培養4日後のプレートを図7に示す。BAL菌の生育は一部の薬剤を除き殺菌・殺虫剤による影響を受けなかった。但し、ジマンダイセン水和剤及びリドミルMZ水和剤が存在するとBAL菌の生育は非常に遅く、培養3日後ではほとんどコロニーが認められず、すなわち、BAL菌の生育が認められなかったが、4日後以降徐々に生育が認められた。またスターナ水和剤及びダコニール1000フロアブルが存在するとBAL菌の生育は全く認められなかった。

## 【0080】

以上の結果はBAL菌を含む本発明の植物病害防除剤または防除資材が、多くの慣行的な殺菌・殺虫剤と混合施用、または混合せずに交互施用もしくは同時施用できることを示唆している。

## 【0081】



【表 8】

BAL 菌に対する慣行的な殺菌・殺虫剤の影響

	農薬名	希釈倍数	菌の生育状況'
殺菌剤	アミスター20フロアブル	2000	+
	ジマンダイセン水和剤	1000	±
	ロブラール水和剤	1000	+
	リゾレックス水和剤	1000	+
	スターナ水和剤	2000	-
	ダコニール 1000 フロアブル	1000	-
	Z ボルドー銅水和剤	500	+
	ベンレート水和剤	2000	+
	リドミル MZ 水和剤	1000	±
殺虫剤	ベストガード水溶剤	2000	+
	DDVP 乳剤	2000	+
	アフーム乳剤	2000	+
	アドマイヤー水和剤	2000	+
	ランネート 45 水和剤	2000	+
	パダン SG 水溶剤	1500	+
	モスピラン水溶剤	4000	+
	エルサン乳剤	2000	+
	アクタラ顆粒水溶剤	3000	+
	コテツフロアブル	2000	+
	トレボン乳剤	2000	+

\*+:培養 3 日後にコロニーが認められた ±:生育が遅く培養 4 日後にコロニーが認められた -:コロニーが認められない

## 【実施例 1 1】

## 【0082】

BAL 菌によるかいよう病菌 (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) の増殖抑制

BAL 菌を YPA 斜面培地から 1 白金耳かき取り、300mL 容三角フラスコに入れた AG 培地 100mL に接種し、振幅 10cm、120 回/分の往復振とう機を用いて 25℃ で 48 時間振とう培養した。この培養液にかいよう病菌懸濁液を 100  $\mu$ L 接種し、同様の条件で更に 48 時間振とう培養した。ここで使用したかいよう病菌懸濁液は、PSA 斜面培地で培養したかいよう病菌を 1 白金耳かき取り滅菌水 9mL に懸濁して調製したものである。対照実験（無処理区）として、BAL 菌を接種していない AG 培地 100mL にかいよう病菌懸濁液を 100  $\mu$ L 接種して同様に 25℃ で 48 時間振とう培養した。各培養液をそれぞれ段階希釈法（実施例 1 参照）により希釈し、各希釈倍率（10 万倍、100 万倍、1000 万倍）につき 100  $\mu$ L ずつ径 9cm の YPA 平板培地に塗布し、25℃ で 72 時間培養し、生育したかいよう病菌のコロニー数を計測した。かいよう病菌コロニー数計測結果を表 9 に示す。またコロニーの様子を図 8 に示す。このように、かいよう病菌を BAL 菌と共に 25℃ で 48 時間振とう培養したとき、かいよう病菌の増殖は完全に抑制された。

## 【0083】

## 【表 9】

希釈倍数	バチルス菌混合 AG 培地	AG 培地
10 <sup>5</sup>	0	1079
10 <sup>6</sup>	0	132
10 <sup>7</sup>	0	55

## 【実施例 1 2】

## 【0084】

BAL菌による青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) の増殖抑制

BAL菌をYPA斜面培地から1白金耳かき取り、300mL容三角フラスコに入れたAG培地100mLに接種し、振幅10cm、120回/分の往復振とう機を用いて25℃で48時間振とう培養した。この培養液に青枯病菌懸濁液を100 $\mu$ L接種し、同様の条件で更に120時間振とう培養した。ここで使用した青枯病菌懸濁液は、PSA斜面培地で培養した青枯病菌を1白金耳かき取り滅菌水9mLに懸濁して調製したものである。対照実験（無処理区）として、BAL菌を接種していないAG培地100mLに青枯病菌懸濁液を100 $\mu$ L接種して同様に25℃で120時間振とう培養した。各培養液をそれぞれ段階希釈法（実施例1参照）により希釈し、各希釈倍率（100万倍、1000万倍）につき100 $\mu$ Lずつ径9cmのYPA平板培地に塗布し、25℃で72時間培養し、生育した青枯病菌のコロニー数を計測した。青枯病菌コロニー数計測結果を表10に示す。またコロニーの様子を図9に示す。このように、青枯病菌をBAL菌と共に25℃で120時間振とう培養したとき、青枯病菌の増殖は抑制された。

## 【0085】

## 【表10】

希釈倍数	パチルス菌混合 AG 培地	AG 培地
10 <sup>6</sup>	48	831

## 【実施例13】

## 【0086】

BAL菌による軟腐病菌 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) の増殖抑制

BAL菌をYPA斜面培地から1白金耳かき取り、300mL容三角フラスコに入れたAG培地100mLに接種し、振幅10cm、120回/分の往復振とう機を用いて25℃で48時間振とう培養した。この培養液に軟腐病菌懸濁液を100 $\mu$ L接種し、同様の条件で更に96時間振とう培養した。ここで使用した軟腐病菌懸濁液は、2%ショ糖加用ジャガイモ煎汁寒天培地（以下PSA）斜面培地で培養した軟腐病菌を1白金耳かき取り滅菌水9mLに懸濁して調製したものである。対照実験（無処理区）として、BAL菌を接種していないAG培地100mLに軟腐病菌懸濁液を100 $\mu$ L接種して同様に25℃で96時間振とう培養した。各培養液をそれぞれ段階希釈法（実施例1参照）により希釈し、各希釈倍率（100万倍、1000万倍）につき100 $\mu$ Lずつ径9cmのYPA平板培地に塗布し、25℃で72時間培養し、生育した軟腐病菌のコロニー数を計測した。軟腐病菌コロニー数計測結果を表11に示す。またコロニーの様子を図10に示す。このように、軟腐病菌をBAL菌と共に25℃で96時間振とう培養したとき、軟腐病菌の増殖は完全に抑制された。

## 【0087】

## 【表11】

希釈倍数	パチルス菌混合 AG 培地	AG 培地
10 <sup>6</sup>	0	1259
10 <sup>7</sup>	0	187

## 【実施例14】

## 【0088】

白菜軟腐病抑制

白菜葉柄を水道水、蒸留水、70%エタノールの順で洗浄し、水気をキムワイプでふき取り大型ガラスシャーレに入れた。軟腐病菌 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) をYPA斜面培地で3日間培養し、蒸留水9mLに懸濁して1 $\times$ 10<sup>7</sup>cfu/mlの菌液とした。この菌液1

mlにBAL菌培養液1mlを加えよく攪拌した後、木綿針8本を浸し白菜葉柄に傷をつけて接種した。接種後は乾かないようにパラフィンフィルムでガラスシャーレをシールして30℃のインキュベーターに1晩静置した。対照実験（無処理区）として菌液1mlに蒸留水1mlを混合した液を同様に針接種した。調査は被害率を軟化腐敗の見られない葉柄切片を－、軟化腐敗している葉柄切片を＋として評価した。また、次式により防除価を算出した。防除価＝100－（処理区の発病率／無処理区の発病率）×100。結果を表12に示す。また実験開始後1日目の様子を図11に示す。

【0089】

【表12】

	1区	2区	被害率	防除価
無処理	＋	＋	100	
BAL菌混合	－	－	0	100

【実施例15】

【0090】

イネ苗立枯細菌病菌 (*Burkholderia plantarii*) およびイネもみ枯細菌病菌 (*Burkholderia glumae*) の種子伝染抑制

人工汚染粉調整のための培養液はイネ苗立枯細菌病菌（社団法人日本植物防疫協会保存菌）をPPG培地（ジャガイモ 200g、リン酸二ナトリウム12水和物 (wako) 3g、リン酸二カリウム (wako) 0.5g、ペプトン 5g（日本製薬株式会社） 5g、塩化ナトリウム (wako) 3g、グルコース (wako) 5g、蒸留水 1リットル）で3日間、25℃で振盪培養した。汚染させる粉はあらかじめケミクロンG（日本曹達株式会社）250倍液で30分間浸漬消毒し、その後流水で45分間水洗し乾燥させた粉を使用した。100ml容ビーカーに種子15g、該菌を含む培養液を30ml入れ、真空ポンプ (yamato MINIVAC PS-22) を用い減圧下で汚染させた。

【0091】

50ml容ファルコンチューブに上記汚染種子3g、および、おから抽出液（おから50gを蒸留水100mlに懸濁し、ガーゼでろ過。121℃20分間高压滅菌）で5日間振盪培養したBAL菌含有培養液（以下BAL菌培養液とする）30mlをそれぞれ入れ浸漬処理を行った。室温で48時間浸漬処理した種子1.5gをくみあい粒状培土D（呉羽化学）を100ml入れたポリエチレン製、直径10cm高さ5.5cmのアイスクリームカップに播種した。対照としてBAL菌培養液による浸漬処理をしていない汚染種子を同様に播種した。32℃の暗所で催芽してから20℃の人工気象室で緑化・管理を続け、播種後16日目に全株を抜いて発病調査を行った（作物病原菌研究技法の基礎－分離・培養・接種－ 大畑貫一編 社団法人日本植物防疫協会）。枯死苗・褐変苗を発病株として調査を行った。発病率を算出し次式により防除価を算出した。防除価＝100－（処理区の発病率／無処理区の発病率）×100。結果を表13に示す。また実験開始後16日目の様子を図12に示す。

【0092】

【表13】

イネ粉枯細菌病菌汚染種子に対する BAL 菌培養液浸漬処理の効果

	健全株数	発病株数	発病率	防除価
汚染種子	1	49	98.0	－
浸漬処理	30	15	33.3	66.0

上記と同様の実験操作を、イネもみ枯細菌病菌（社団法人日本植物防疫協会保存菌）に

についても行った。もみ枯細菌病については枯死苗、重症苗（草丈が健全の1/2未満のもの）を発病株として調査を行った。結果を表14に示す。また実験開始後16日目の様子を図12に示す。

【0093】

【表14】

イネ苗立枯細菌病菌汚染種子に対する BAL 菌培養液浸漬処理の効果

	健全株数	発病株数	発病率	防除価
汚染種子	4	43	91.5	—
浸漬処理	33	12	26.7	70.9

【実施例16】

【0094】

イネいもち病菌(*Pyricularia grisea*)胞子の発芽抑制効果

BAL菌培養液の原液と5倍希釈(発芽試験時の最終濃度としては2倍希釈、10倍希釈)したもの及び対照区として蒸留水をサンプルとした。PS培地(ジャガイモ煎汁液に砂糖2%を加用した培地)に懸濁したイネいもち病菌の胞子(砂糖加用オートミール寒天培地で菌叢を生育させBLB照射で形成)とサンプルから各々20 $\mu$ Lをホールスライドグラスにとりよく混合し25℃で24時間湿室に静置した後、顕微鏡を用いて発芽管の有無を観察した。サンプル混合24時間後のイネいもち病菌胞子を図13に示す。培養液を混合したものは原液、5倍希釈ともにイネいもち病菌胞子の発芽が抑制されており、発芽した胞子は観察されなかった。

【実施例17】

【0095】

ごま葉枯病菌(*Cochliobolus miyabeanus*)胞子発芽の発芽抑制効果

YPA培地(0.5%酵母エキス(日本製薬株式会社)、1%ポリペプトン(日本製薬株式会社)、0.5%塩化ナトリウム、pH 7.00、高圧滅菌20分間)100mLを入れた300mL容量の三角フラスコに、YPA斜面培地で培養したBAL菌を1白金耳植菌した後、25℃で72時間、振とう培養(120回/分)した。得られた培養液の原液、5倍希釈液、10倍希釈液をサンプルとした。また蒸留水を用いて同様に処理したものを無処理区とした。蒸留水に懸濁したイネごま葉枯病菌(PSA培地にイネごま葉枯病菌の前培養菌を植菌し、25℃下で7~10日間培養して形成)の胞子をサンプル1mLに対して100 $\mu$ L加えてよく攪拌したものをホールスライドグラスに50 $\mu$ Lとり25℃で24時間湿室に静置した後、顕微鏡を用いて発芽管の有無及び形状を観察した。サンプル混合24時間後のごま葉枯病菌胞子を図14に示した。培養液の原液では胞子が発芽せず、5倍希釈・10倍希釈では発芽管の伸長が抑制され膨潤奇形を起こしており、発芽管の伸長は観察されなかった。

【実施例18】

【0096】

BAL菌培養液の地上部散布によるイネごま葉枯病防除

人工気象機内で育成した6~7葉期のイネ(品種:日本晴)にBAL菌培養液あるいは対照区として蒸留水を散布し、25℃、16時間日長下で24時間経過後に、イネごま葉枯病菌(*Cochliobolus miyabeanus*)胞子懸濁液を噴霧接種した。この胞子懸濁液は、イネごま葉枯病菌(*Cochliobolus miyabeanus*)を予めPSA培地で培養し、培養シャーレに蒸留水を注ぎ筆で菌叢を擦って胞子を洗い落とし、二重にしたガーゼでろ過した後、胞子濃度が顕微鏡の100倍の視野当たり10個の割合となり、且つTween20を0.02%含むように調製したものである。接種後、イネにプラスチック容器を被せて気温25℃の湿室とし24時間静置した。接種6日後に接種時の完全展開葉の全病斑数と葉面積を計測し1cm<sup>2</sup>当たりの平均病斑数を算出し、その数値を基に次式、

防除価 = 100 - (処理区の平均病斑数) / (対照区の平均病斑数) × 100

により防除価を求めた。結果を表15に示す。BAL菌培養液の防除価は89.7となり、イネごま葉枯病を抑制できることが示された。

【0097】

【表15】

	計測した全葉 合計面積 (cm <sup>2</sup> )	病斑数	1cm <sup>2</sup> 当たりの 病斑数	防除価
処理区 (培養液)	264.1	102	0.39	89.7
対照区 (水)	352.38	1316	3.73	—

【実施例19】

【0098】

BAL菌培養液のキュウリ灰色かび病菌(Botrytis cinerea)抑制効果

キュウリの子葉部を胚軸部分から切り取り、水を含ませたペーパータオルを敷いた容器中に切断面をペーパータオルにつけるように置いた。あらかじめ灰色かび病菌を2%ショ糖加用ジャガイモ煎汁寒天培地 (PSA) 上で生育させ、BLB照射下で形成させておいた胞子を2%グルコース加用ジャガイモ煎汁培地 (PG) に懸濁した。懸濁液の胞子密度を $2 \times 10^7$  個/mLに調整した後、1区当たり10枚の子葉の中央に50  $\mu$ L滴下しペーパーディスク (東洋濾紙 抗生物質検定用 厚手 径8mm) をその上に接着させた。更にペーパーディスクの上からBAL菌培養液または対照として蒸留水あるいはイプロジオン水和剤 (ロブラール) (希釈倍率1000倍) を50  $\mu$ L滴下した後、容器を密閉し20℃、16時間日長下に置いた。

【0099】

試験結果を表16及び図15に示した。効果は感染によるペーパーディスク周辺の褐変径で表した。また、防除価は蒸留水との比較で次式、

防除価 =  $100 - (\text{処理区の平均褐変径}) / (\text{蒸留水の平均褐変径}) \times 100$

により算出した。接種3日後の子葉の褐変の様子を図12に、褐変径の子葉10枚の平均を表16に示した。培養液を滴下したものは対照区に比較し明らかに褐変径が小さく、従ってキュウリ灰色かび病が抑制されていた。

【0100】

【表16】

	蒸留水	イプロジオン水和剤	培養液
平均褐変径 (mm)	19.6	11.2	3.3
防除価	—	42.9	83.2

【実施例20】

【0101】

BAL菌培養液の地上部散布によるキュウリ褐斑病防除

ビニールハウス内で2004年4月28日に催芽させたキュウリ (品種: 松風) を育苗し、本葉2枚展開時の幼苗にBAL菌培養液あるいは対照区として蒸留水またはダコニール1000 (希釈倍率1000倍) を十分量散布した。25℃で5時間後経過し散布液が乾いた後に、予めPSA培地で培養し、シャーレに蒸留水を注ぎ筆で菌叢を擦って胞子を洗い落とし、二重のガーゼでろ過し胞子濃度 $10^5$  個/mLに調製したキュウリ褐斑病菌 (*Corynespora casicola*: 武蔵野種苗園 病理バイテク研究室保存菌) 胞子懸濁液を噴霧接種した。接種後、キュウリにプラスチック容器を被せて湿室とし気温25℃下で、24時間静置後、25℃で16時間日長下で管理した。接種20日後に接種時の完全展開葉の全病斑数を計測し1枚当たりの平均病斑数を求め、その数値を基に次式、

防除価 =  $100 - (\text{処理区の平均病斑数}) / (\text{無処理区の平均病斑数}) \times 100$   
 により防除価を求めた。結果を表17に示す。表17において、1-1、1-2、2-1、2-2はそれぞれ、1個体目の第1葉、1個体目の第2葉、2個体目の第1葉、2個体目の第2葉を示す。また各処理区の実験開始後20日目の様子を図16に示す。BAL菌培養液およびダコニール1000の防除価はともに100となり、ダコニール1000と同程度にキュウリ褐斑病を抑制できる。

【0102】

【表17】

	病斑数					防除価
	1-1	1-2	2-1	2-2	平均	
BAL 菌培養液	0	0	0	0	0	100
ダコニール区	0	0	0	0	0	100
無処理区(蒸留水)	53	68	74	5	50	—

【実施例21】

【0103】

黒斑病 (*Alternaria brassicae*) に対するBAL菌培養液の効果試験

BAL菌をYPA斜面培地から1白金耳かき取り、300mL容三角フラスコに入れたおから抽出培地100mLに接種し、振幅10cm、120回/分の往復振盪機を用いて25℃で4日間振盪培養した。このBAL菌培養液をカブ(品種 夏蒔13号小蕪、播種日2004年3月10日、接種時生育度本葉3枚、径75mmクロポリ鉢で20日間栽培)の葉面に小型ハンドスプレーで均一に噴霧し、25℃下の湿室に24時間置いた。予めPSA平板培地で培養しておいた黒斑病菌 (*Alternaria brassicae*、株式会社武蔵野種苗園 病害・バイテク研究室保存菌)の胞子を蒸留水に懸濁し、この懸濁液をカブの葉面に小型ハンドスプレーで均一に噴霧後、25℃下の湿室に24時間置き、病徴が現れるまで20℃で管理した。接種時の胞子懸濁液濃度は、200倍で1視野40個程度になるよう希釈した。対照として、BAL菌培養液の代わりに水を噴霧する区(無処理区)、既存の防除剤としてイプロジオン水和剤の1000倍液を噴霧する区を設けた。調査は、以下の発病指数に基づき、各処理個体につき3枚ずつ行った。

【0104】

発病指数0: 病徴なし

発病指数1: 病徴面積が葉面積の25%以下

発病指数2: 病徴面積が葉面積の25%~50%

発病指数3: 病徴面積が葉面積の50%以上

発病指数4: 枯死株

【0105】

調査結果から次式、

$$\text{発病度} = (1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / (4 \times \text{調査個体総数})$$

により発病度を算出した。なお、式中の文字  $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$ 、 $n_4$  はそれぞれ、発病指数1、2、3、4を示した個体数を表す。

算出された発病度から次式、

$$\text{防除価} = 100 - \text{処理区の発病度} / \text{無処理区の発病度} \times 100$$

により防除価を算出した。

【0106】

結果を表18に示す。また図17には発病評価時の葉の様子を示す。このように、BAL菌の培養液を散布することで黒斑病が完全に抑制された。

【0107】

【表 18】

	発病度	防除価
水(無処理区)	83.3	—
BAL 菌培養液	0.0	100.0
イプロジオン 1000 倍液	0.0	100.0

## 【実施例 22】

【0108】

## 白さび病菌 (Albugo macrospora) に対するBAL菌培養液の効果試験

BAL菌をYPA斜面培地から1白金耳かき取り、300mL容三角フラスコに入れたおから抽出培地100mLに接種し、振幅10cm、120回/分の往復振盪機を用いて25℃で4日間振盪培養した。このBAL菌培養液をチンゲンサイ(品種 福賞味、播種日2004年2月12日、接種時生育度 本葉5枚、径75mmクロポリ鉢で30日間栽培)の葉面に小型ハンドスプレーで均一に噴霧し、25℃下の湿室に24時間置いた。更に、25℃下に24時間置いた後、育種圃場でコマツナに自然発病した白さび病菌 (Albugo macrospora) の分生子層から採種した遊走子のうを蒸留水に懸濁し、小型ハンドスプレーで噴霧接種後、11℃下の湿室に24時間静置した。接種時の遊走子のう懸濁液濃度は、200倍で1視野30個程度になるよう希釈した。病徴が現れるまで、夜間のみトンネル、加温のハウスで管理した。対照として、BAL菌培養液の代わりに水を噴霧する区(無処理区)を設けた。各処理個体とも接種時の葉身2枚における単位面積当たりの分生子層数を調査した。この調査結果から、処理区の防除価を次式、

防除価 =  $100 - (\text{処理区}1\text{cm}^2 \text{の分生子層数} / \text{無処理区}1\text{cm}^2 \text{の分生子層数}) \times 100$   
により算出した。

【0109】

結果を表19に示す。また図18には発病した葉の様子を示す。このように、BAL菌培養液の散布による防除価は高く、実用性が認められる。

【0110】

【表 19】

	分生子層数/cm <sup>2</sup>	防除価
水(無処理区)	112.0	—
BAL 菌培養液	0.515	99.5

## 【実施例 23】

【0111】

## カブ萎黄病菌 (Fusarium oxysporum f.sp. raphani) に対するBAL菌の効果試験

エコプラン資材(千葉製粉株式会社販売のフスマ堆肥: N 29%、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 38%、K<sub>2</sub>O 2.0%、有機物52.5%、水分35~40%、pH7.5、CN比10)40g、米ぬか10gをよく混合し、121℃で1時間高压滅菌し、24時間後に更にもう1度同条件で高压滅菌を行った。この滅菌資材に滅菌水30mL、珪藻土で10倍希釈したBAL菌オカラ培養粉末(実施例6参照)0.6gを加えよく混和し、30℃下に4日間置いたものをBAL菌培養資材とした。予めPSA平板培地で前培養しておいたカブ萎黄病菌 (Fusarium oxysporum f.sp. raphani、株式会社武蔵野種苗園 病害・バイテク研究室保存菌) を5mm角の大きさに切り取り、300mL容三角フラスコに入れたPG培地100mLに接種し、振幅10cm、120回/分の往復振盪機を用いて25℃で5日間振盪培養した。培養液は2重ガーゼでろ過後、3000rpmで10分間遠心分離し、胞子を集めた。この胞子を蒸留水に懸濁、同条件で遠心分離し沈殿を回収することを2回繰り返して洗浄した。この沈

殿を蒸留水に懸濁し滅菌土に均一に混合して、カブ萎黄病菌胞子を $2 \times 10^7$ 個/ml含む汚染土を作成、25℃下に24時間置いた後、BAL菌培養資材を500kg/10aになるように十分混和し( $1 \times 10^7$ cfu/gのBAL菌を含む)、25℃下に6日間置き、カブ(品種 夏蒔13号小蕪)を2004年5月20日に播種、25℃下で管理した。比較のために、滅菌土、BAL菌培養資材を含まない汚染土(無処理区)、汚染土に播種後ベノミル水和剤の1000倍液3L/m<sup>2</sup>を灌注する化学防除剤区を併せて試験した。播種18日後に子葉の黄化枯死の程度を調査した。

## 【0112】

調査結果から次式、

発病度＝発病株数／調査個体総数

により発病度を算出した。

算出された発病度から次式、

防除価＝100－処理区の発病度／無処理区の発病度×100

により防除価を算出した。

## 【0113】

結果を表20に示す。また図19には実験開始後18日目の様子を示す。BAL菌培養液添加防除資材を施用した区は化学的防除区よりも発病抑制力が高かった。

## 【0114】

## 【表20】

	発病株数		発病度	防除価
	－	＋		
滅菌土	30	0	0.0	－
汚染土(無処理区)	4	26	86.7	－
ベノミル水和剤	6	23	79.3	8.5
防除資材 500kg/10a	15	13	46.4	46.5

※発病株数の－：病徴あり、＋：病徴無し

## 【実施例24】

## 【0115】

苗立枯病菌(*Rhizoctonia solani*)に対するBAL菌の効果試験

エコプラン資材(実施例13に記載)40g、米ぬか10gをよく混合し、121℃で1時間高圧滅菌し、24時間後に更にもう1度同条件で高圧滅菌を行った。この滅菌資材に滅菌水30ml、珪藻土で10倍希釈したBAL菌オカラ培養粉末(実施例6参照)0.6gを加えよく混和し、30℃下に7日間置いたものをBAL菌培養資材とした。この資材を1t/10aになるよう滅菌土に混合し( $5 \times 10^7$ cfu/gのBAL菌を含む)、暗黒下25℃に10日間静置した。PSA平板培地で2日間培養した苗立枯病菌(*Rhizoctonia solani* AG-4, IIIA 苗立枯病系、株式会社武蔵野種苗園 病害・バイテク研究室保存菌)をコルクボーラーで打ち抜き、その菌叢片をアイスクリームカップ(縦7cm、横7cm、高さ5cm)の底面に等間隔に3菌叢片ずつ置いた。BAL菌培養資材を混ぜた滅菌土125mlを菌叢片を被覆するように充填し、ベントグラス(雪印製)100mgを播種し、28℃の人工気象室で管理した。対照区として苗立枯病菌無接種の滅菌土(滅菌土)、苗立枯病菌を接種した滅菌土(無処理)も同様に播種、管理した。播種後11日目に、生存株数を調査し、滅菌土における生存株数を各試験区共通の播種株数として、次式より生存株率及び枯死株率を求めた。

## 【0116】

生存株率＝生存株数／滅菌土の生存株数×100

枯死株率＝100－生存株率

## 【0117】

更に、枯死株率から次式、

防除価＝100－(処理区の枯死株率／無処理区の枯死株率)×100

により防除価を算出した。

## 【0118】



メロン種子（品種 アールスメロン）20粒を9cmシャーレにろ紙1枚敷き蒸留水を4.25ml入れた上に置床し、25℃で2日間催芽させた。25穴セルにクレハ園芸培土を50ml詰め、催芽させた種子を播種し、滅菌土50mlで覆土した。育苗は25℃の人工気象室内で行った。試験に使用した接種源は-30℃で凍結保存しておいたメロンえそ斑点病感染葉（ウイルス起源は長崎県諫早市圃場のウイルス系統）2gを乳鉢に入れ、1/15M リン酸緩衝液 pH6.98 10m1中で磨砕した。磨砕液はガーゼ2重でろ過し、以下の試験に用いた。

#### 【0124】

磨砕液3mlとおから培地で8日間振とう培養したBAL菌培養液3mlを混合し、パラフィルムで封をして25℃のインキュベーター内に静置した。5時間後、22時間後にカーボランダム法（実施例25に準じた）でメロン子葉に接種した。無処理区として磨砕液とリン酸緩衝液を混合した区を設けた。接種後は25℃の人工気象室で管理した。接種後7～8日目に子葉に現れた局部病斑の数を数えて子葉1枚当りの病斑数を計算し、次式により防除価を算出した。5時間後では73.3、22時間後では80であった。

#### 【0125】

防除価 =  $100 - \left( \frac{\text{処理区の子葉1枚あたりの病斑数}}{\text{無処理区の子葉1枚あたりの病斑数}} \right) \times 100$

結果を表23に示す。また図21には発病時の様子を示す。

#### 【0126】

#### 【表23】

	混合 時間	子葉に現れた局部病斑数										子葉1枚当りの 病斑数	防除価
		1株目	2株目	3株目	4株目	5株目	6株目	7株目	8株目	9株目	10株目		
リン酸緩衝液 (無処理区)	5時間	4	2	8	2	9	4	10	18			7.1	—
	22時間	8	12	12	7	4	7	10	6	7	7	8.0	—
BAL菌培養液	5時間	2	3	2	3	1	0	1	1	2	4	1.9	73.3
	22時間	2	2	5	1	1	3	0	0	2	0	1.6	80.0

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0127】

【図1】 BAL菌による黒腐病菌の増殖抑制効果を示す図である。

【図2】 チンゲンサイの黒腐病菌人工汚染種子を発芽させた場合の黒腐病菌発病状況を示す図である。

【図3】 BAL菌含有防除剤処理済み黒腐病菌人工汚染種子の周囲の黒腐病菌の生育状況を示す図である。

【図4】 実施例8における実験開始後9日目の様子を示す図である。

【図5】 実施例8における実験開始後9日目の様子を示す図である。

【図6】 実施例9における実験開始後26日目の様子を示す図である。

【図7A】 BAL菌の増殖に対する殺菌剤、殺虫剤の影響を示す図である。

【図7B】 BAL菌の増殖に対する殺菌剤、殺虫剤の影響を示す図である。（図7Aの続き）

【図8】 BAL菌によるかいよう病菌の増殖抑制効果を示す図である。

【図9】 BAL菌による青枯病菌の増殖抑制効果を示す図である。

【図10】 BAL菌による軟腐病菌の増殖抑制効果を示す図である。

【図11】 実施例14における実験開始後1日目の様子を示す図である。

【図12】 実施例15における実験開始後16日目の様子を示す図である。

【図13】 実施例16における実験開始後24時間後の様子を示す図である。

【図14】 実施例17における実験開始後24時間後の様子を示す図である。

【図15】 実施例19における灰色かび病に対するBAL菌培養液の効果を示す図である

- 。
- 【図 1 6】 実施例20における実験開始後20日目の様子を示す図である。
  - 【図 1 7】 実施例21における黒斑病に対するBAL菌培養液の効果を示す図である。
  - 【図 1 8】 実施例22における白さび病に対するBAL菌培養液の効果を示す図である。
  - 【図 1 9】 実施例23における実験開始後18日目の様子を示す図である。
  - 【図 2 0】 実施例24における実験開始後11日目の様子を示す図である。
  - 【図 2 1】 実施例25におけるTMVに対するBAL菌培養液の効果を示す図である。
  - 【図 2 2】 実施例26におけるメロンえそ斑点病に対するBAL菌培養液の効果を示す図である。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Kabusikikaisha Itsuki

<120> Method and agent for treating and preventing plant diseases by using bacterium belonging to the genus of Bacillus

<130> P04-0640

<150> JP 2004-55059

<151> 2004-02-27

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1545

<212> DNA

<213> Bacillus sp.

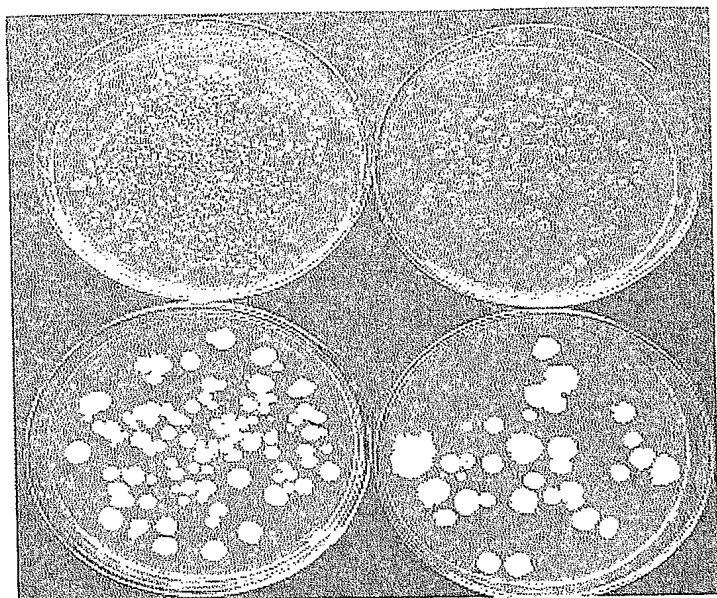
<400> 1

```
tggagagttt gatcctggct caggacgaac gctggcggcg tgcctaatac atgcaagtcg      60
agcggacaga tgggagcttg ctccctgatg ttagcggcgg acgggtgagt aacacgtggg      120
taacctgcct gtaagactgg gataactccg ggaaaccggg gctaataccg gatggttgtc      180
tgaacygcat gggtcagaca taaaaggtgg cttyggctac cacttacaga tggacccgcg      240
gcgcattagc tagttgggtg ggtaacggct caccaaggcg acgatgcgta gccgacctga      300
gagggtgatc ggccacactg ggactgagac acggcccaga ctctacggg aggcagcagt      360
agggaatctt ccgcaatgga cgaaagtctg acggagcaac gccgcgtgag tgatgaaggt      420
tttcggatcg taaagctctg ttgttaggga agaacaagtg ccgttcaaatt agggcggcac      480
cttgacggta cctaaccaga aagccacggc taactacgtg ccagcagccg cggtataacg      540
taggtggcaa gcgttgtccg gaattattgg gcgtaaaggg ctgcagggcg gtttcttaag      600
tctgatgtga aagcccccg ctcaaccggg gagggtcatt ggaaactggg gaacttgagt      660
gcagaagagg agagtggaat tccacgtgta gcggtgaaat gcgtagagat gtggaggaac      720
accagtggcg aaggcgactc tctggtctgt aactgacgct gaggagcgaa agcgtgggga      780
gcgaacagga ttagataccc tggtagtcca cgccgtaaac gatgagtgct aagtgttagg      840
```

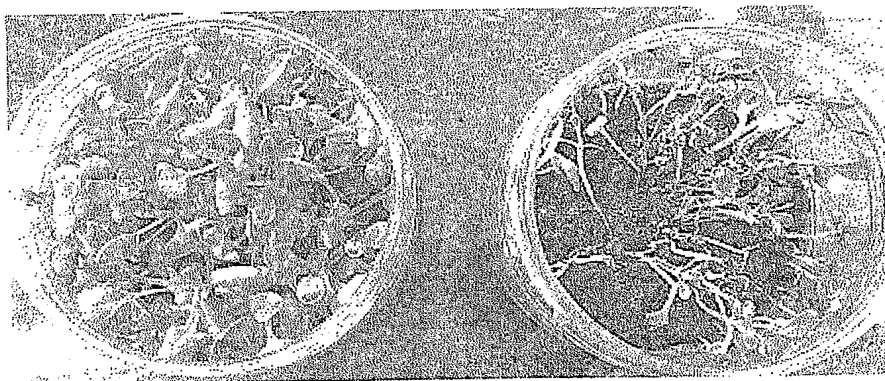
gggtttccgc cccttagtgc tgcagctaac gcattaagca ctccgcctgg ggagtacggt 900  
cgcaagactg aaactcaaag gaattgacgg gggcccgcac aagcgggtgga gcatgtggtt 960  
taattcgaag caacgcgaag aaccttacca ggtcttgaca tcctctgaca atcctagaga 1020  
taggacgtcc ccttcggggg cagagtgaca ggtggtgcat ggttgctgctc agctcgtgctc 1080  
gtgagatggt ggggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt gatcttagtt gccagcattc 1140  
agttgggcac tctaaggtga ctgccggtga caaaccggag gaaggtgggg atgacgtcaa 1200  
atcatcatgc cccttatgac ctgggctaca cacgtgctac aatggacaga acaaaggga 1260  
gcgaaaccgc gaggttaagc caatcccaca aatctgttct cagttcggat cgcagtctgc 1320  
aactcgactg cgtgaagctg gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata 1380  
cgttcccggg ccttgtagac accgcccgtc acaccacgag agtttgtaac acccgaagtc 1440  
ggtgaggtaa cctttatgga gccagccgcc gaaggtggga cagatgattg ggggtgaagtc 1500  
gtaacaaggt agccgtatcg gaaggtgcgg ctggatcacc tcctt 1545

【書類名】 図面

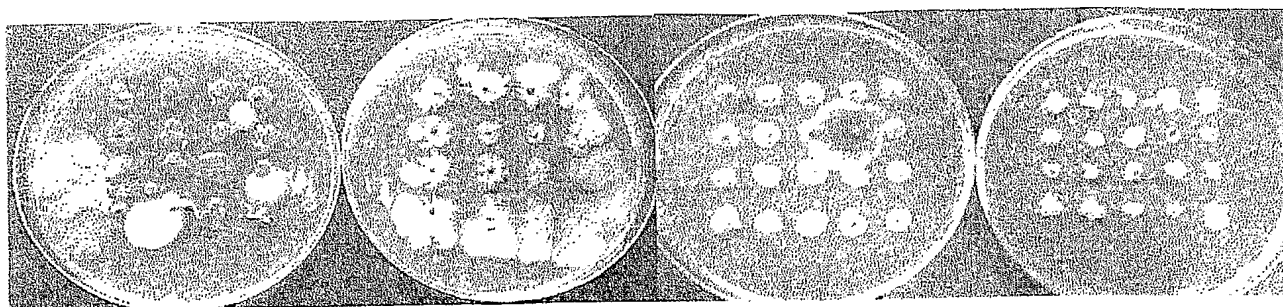
【図 1】



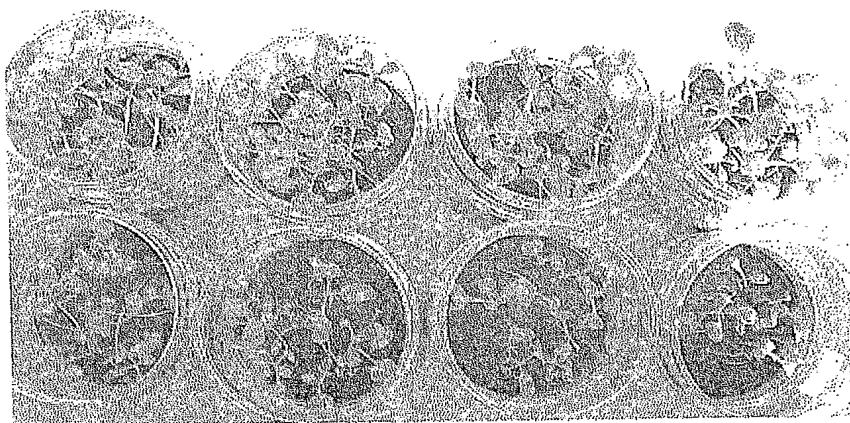
【図 2】



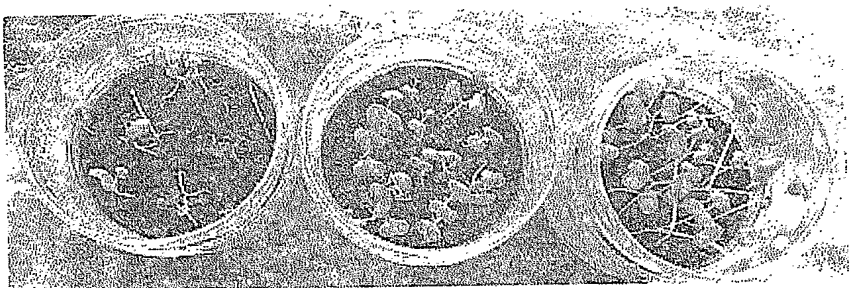
【図 3】



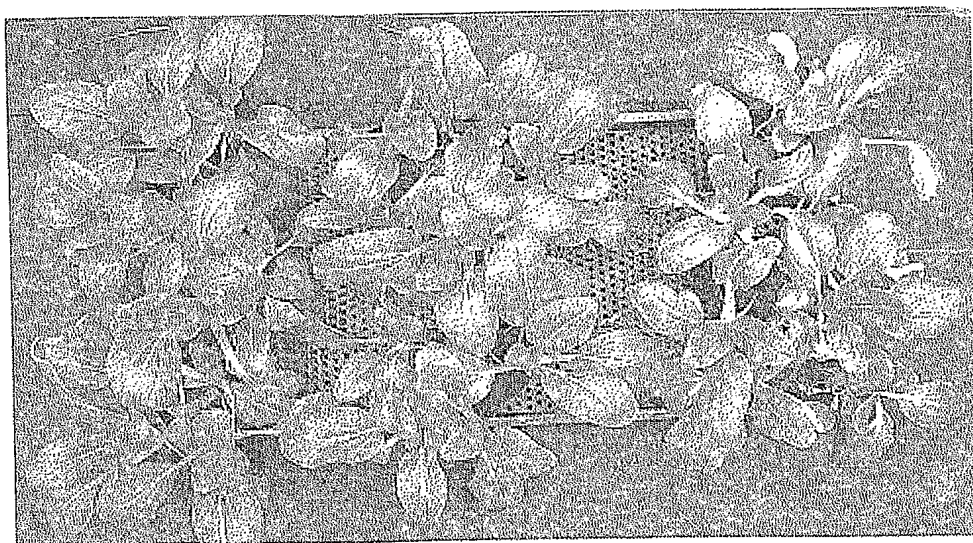
【図 4】



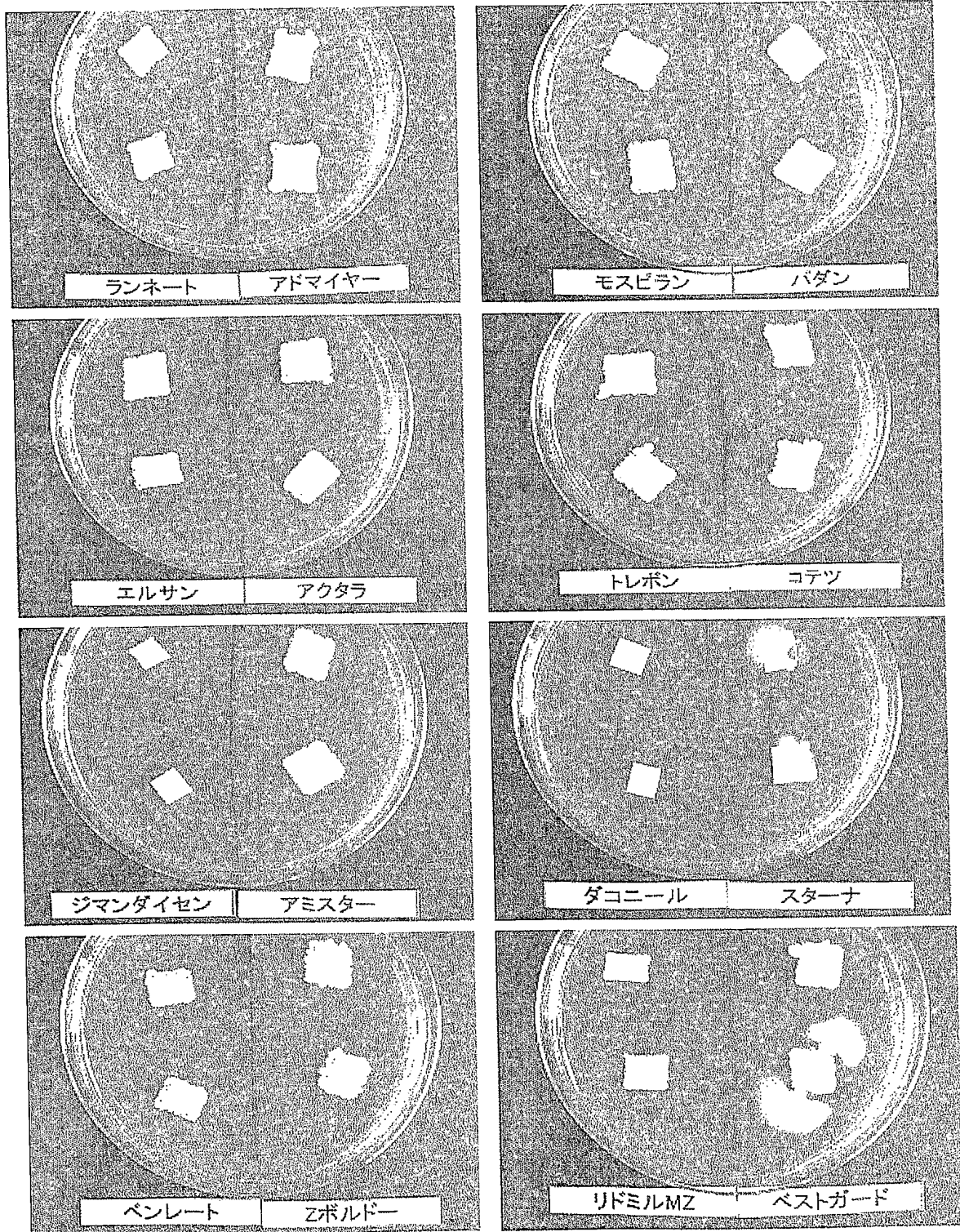
【図 5】



【図 6】

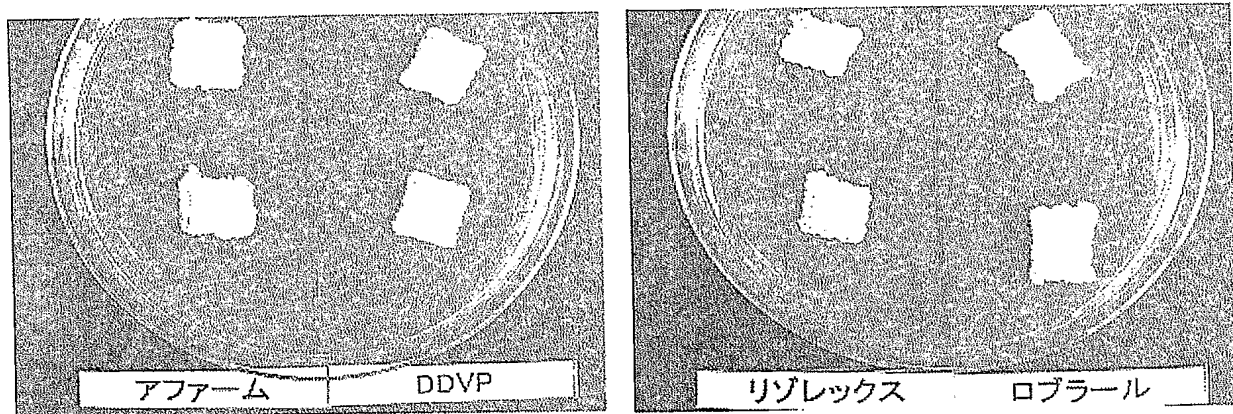


【図 7 A】

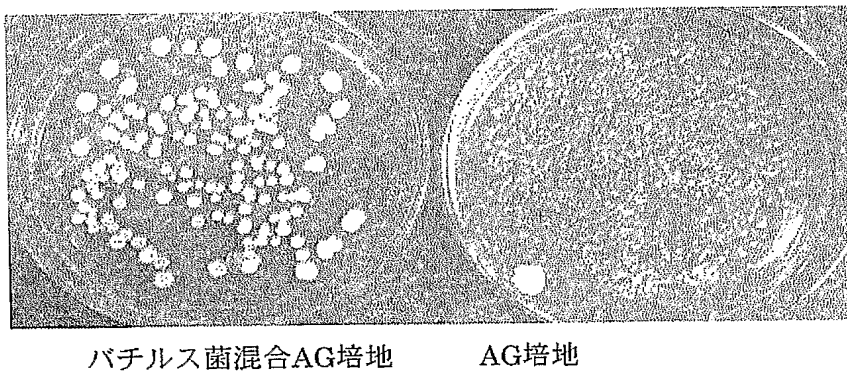




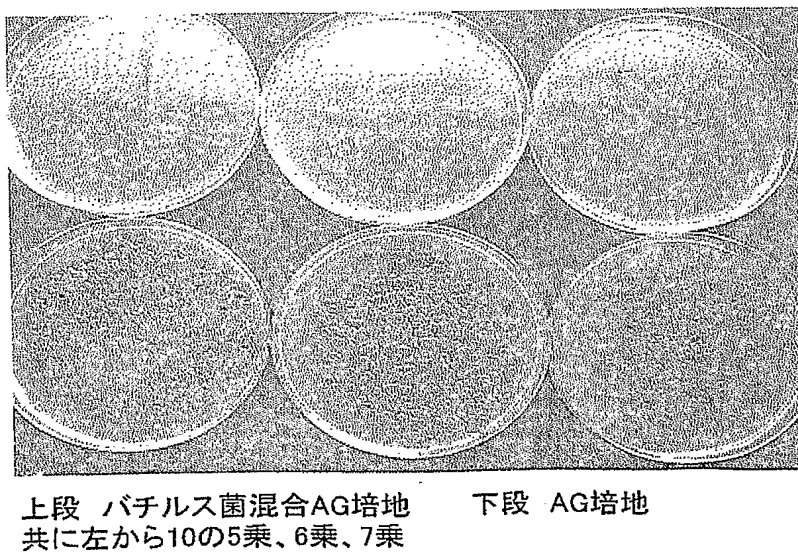
【図7B】



【図8】

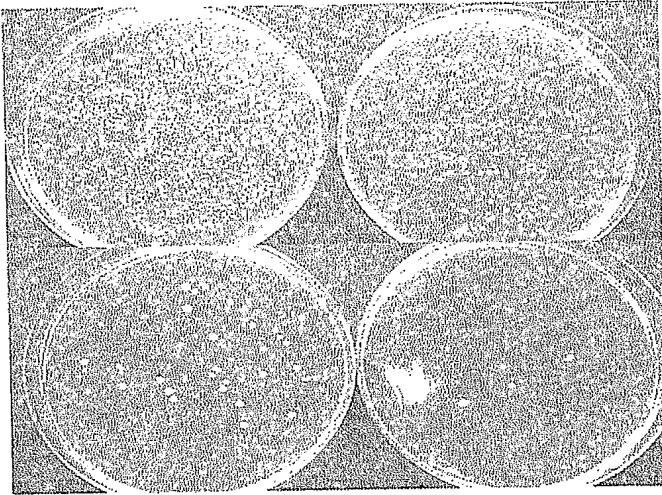


【図9】





【図 10】



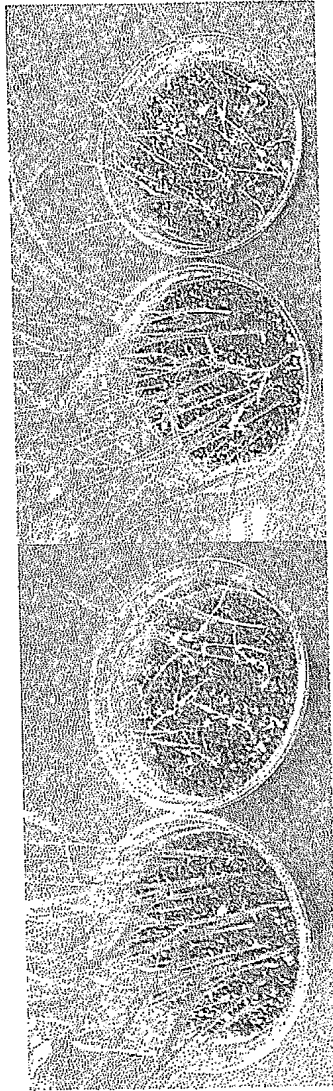
上段 バチルス菌混合AG培地 下段 AG培地  
共に左から10の6乗、7乗

【図 11】



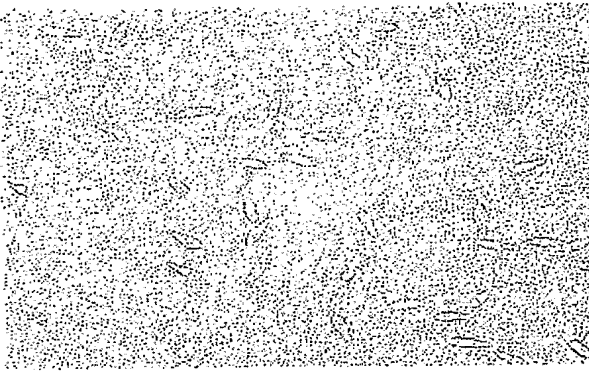
軟化腐敗をした切片(+) 軟化腐敗していない切片(-)

【図 12】

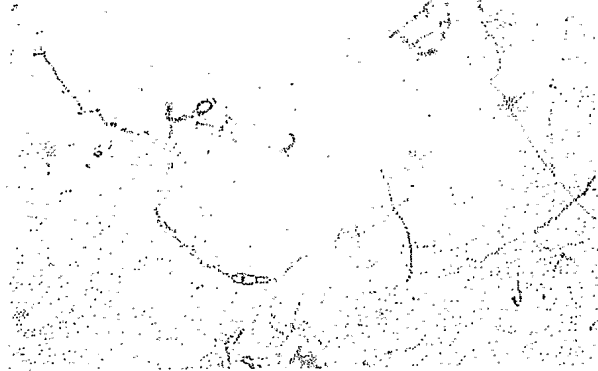


イネ枯細菌病(左:48時間浸漬処理 右:無処理) イネ苗立枯細菌病(左:48時間浸漬処理 右:無処理)

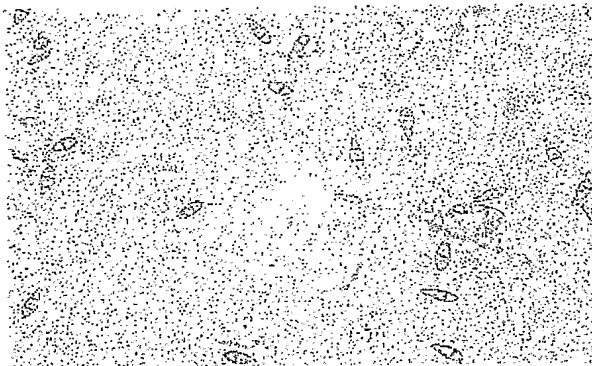
【図 13】



原液(2倍)



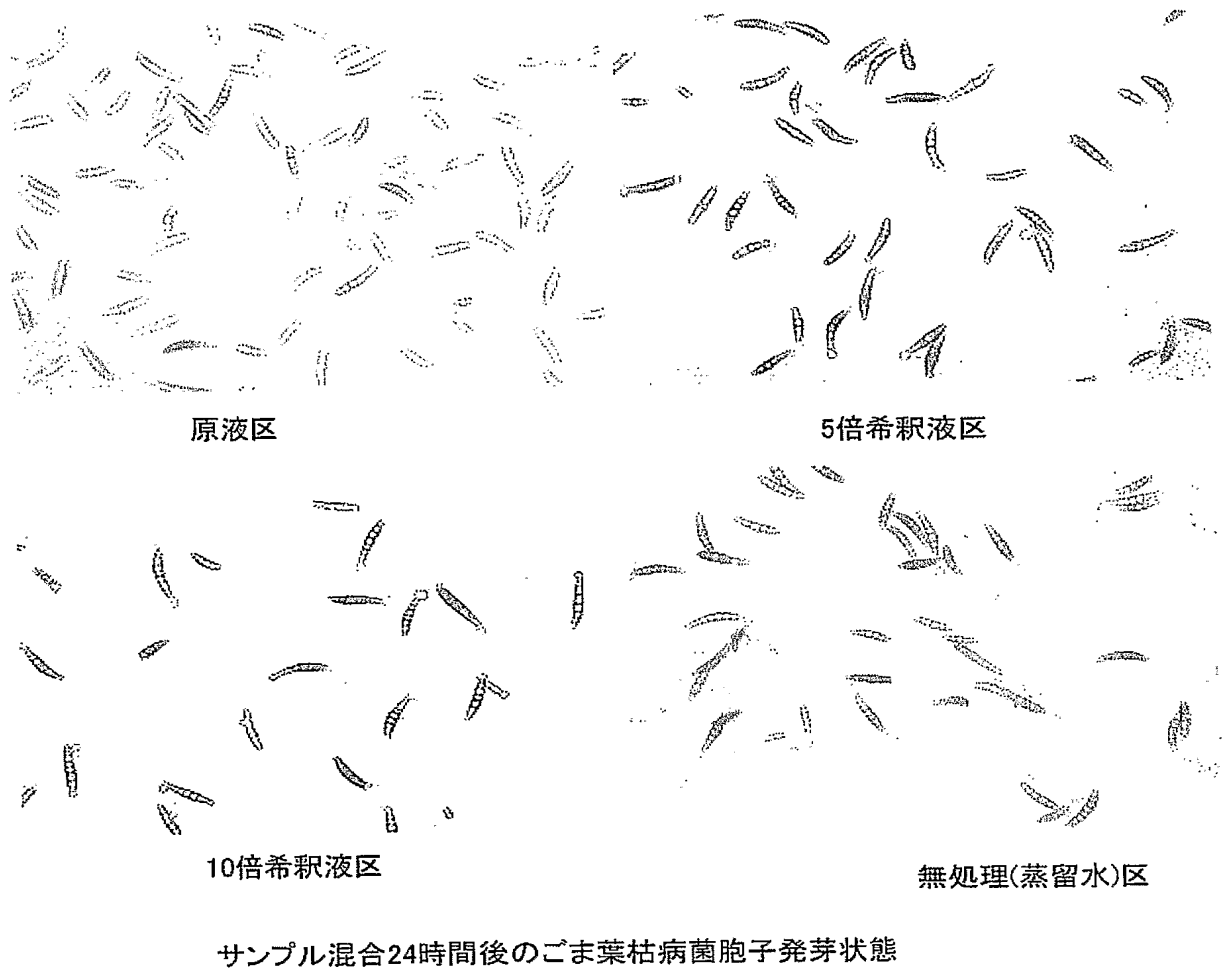
蒸留水



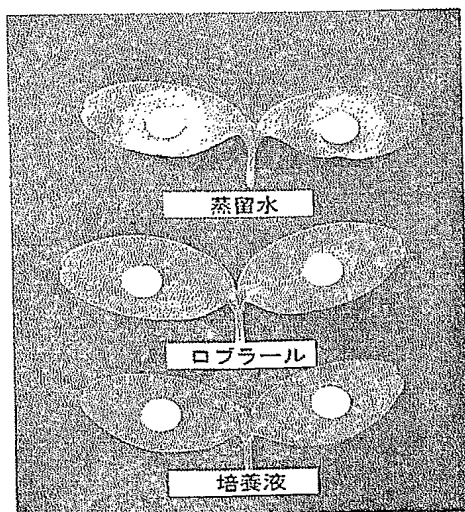
5倍希釈(10倍)

サンプルと混合24時間後のイネいもち病菌胞子発芽状態  
注:カッコ内は発芽試験時の最終濃度

【図 14】

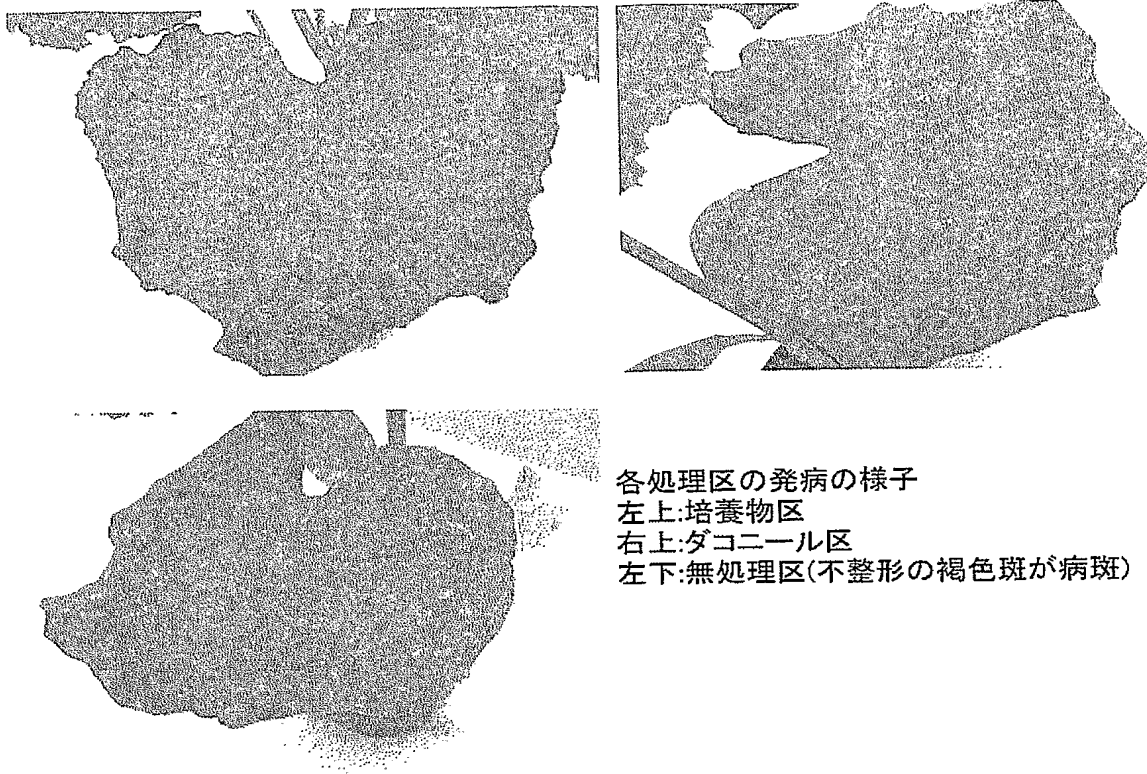


【図 15】

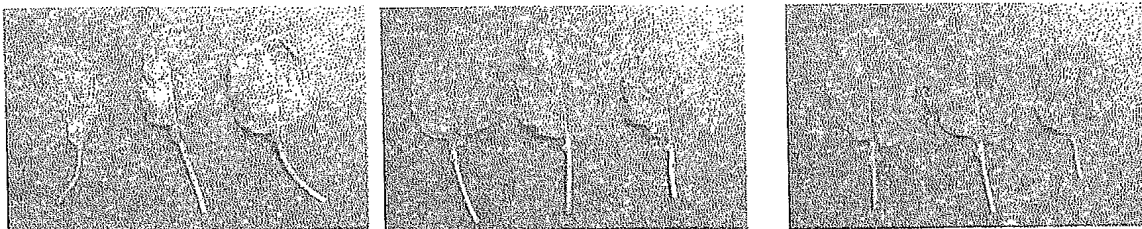


接種3日後の子葉の褐変

【図 16】



【図 17】

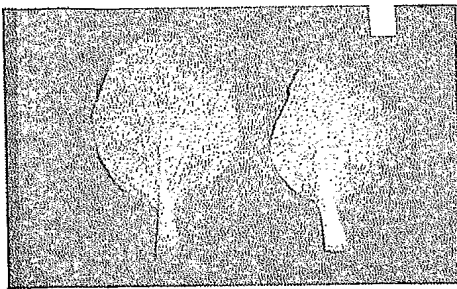


無処理

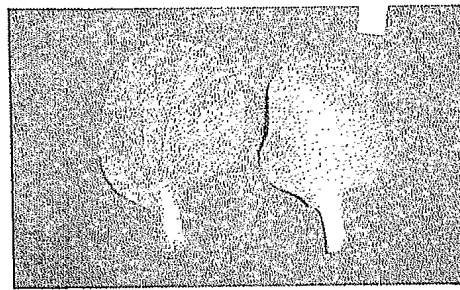
BAL菌培養液

イプロゾン水和剤

【図 18】



無処理区

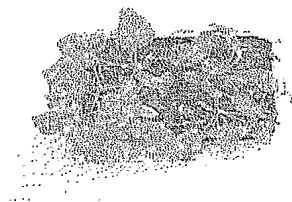


BAL培養液処理区

【図 19】



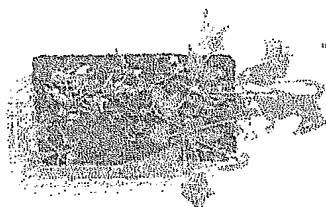
滅菌土



無処理

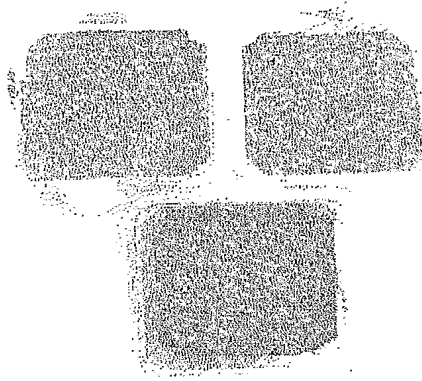


防除資材  
500kg/10a



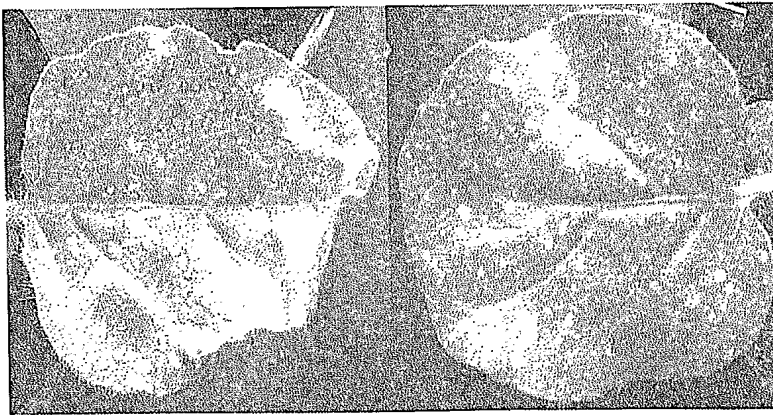
ベノミル水和剤

【図 20】



上段左:無処理、右:滅菌土  
下段:防除資材1t/10a

【図 21】



無処理

処理

【図 22】



局部病斑

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、植物病原性の細菌、糸状菌またはウイルスが原因となる植物病害を生物的に防除するための防除剤または防除資材、それらを用いた植物病害の防除方法、およびそれらに使用することができる細菌を提供する。

【解決手段】 本発明は、植物病原性の細菌、糸状菌またはウイルスの感染または増殖を抑制する能力を有するバチルス属に属する細菌を含む、植物病害の防除剤または防除資材、それを植物に施用する方法、ならびに、およびそれらに使用することができる細菌に関する。

【選択図】 なし



特願 2 0 0 4 - 2 1 6 0 8 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 0 4 0 7 8 5 1 2 ]

1. 変更年月日

2 0 0 4 年 2 月 2 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県朝霞市幸町 3 丁目 1 2 番 5 号

氏 名

株式会社 イツキ